

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

ISABELA ALMODOVA ARANDA

**IMOBILIZAÇÃO DE CÉLULAS DE *Aspergillus oryzae* IPT-301 EM ESPONJA
VEGETAL PARA A SÍNTESE ENZIMÁTICA DE FRUTO-OLIGOSSACARÍDEOS**

POÇOS DE CALDAS – MG

2024

ISABELA ALMODOVA ARANDA

**IMOBILIZAÇÃO DE CÉLULAS DE *Aspergillus oryzae* IPT-301 EM ESPONJA
VEGETAL PARA A SÍNTESE ENZIMÁTICA DE FRUTO-OLIGOSSACARÍDEOS**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para
obtenção do título de Mestre em Engenharia Química,
pela Universidade Federal de Alfenas. Área de
Concentração: Engenharia Química
Orientador: Prof. Dr. Rafael Firmani Perna

POÇOS DE CALDAS – MG

2024

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Campus Poços de Caldas

Aranda, Isabela Almodova.

Imobilização de células de *Aspergillus Oryzae* IPT-301 em esponja vegetal para a síntese enzimática de fruto-oligossacarídeos / Isabela Almodova Aranda. - Poços de Caldas, MG, 2024.

93 f. : il. -

Orientador(a): Rafael Firmani Perna.

Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Alfenas, Poços de Caldas, MG, 2024.

Bibliografia.

1. *Aspergillus oryzae*. 2. Esponja vegetal. 3. Imobilização. 4. Células biocatalíticas. 5. frutossiltransferase. I. Perna, Rafael Firmani, orient. II. Título.

ISABELA ALMODOVA ARANDA

IMOBILIZAÇÃO DE CÉLULAS DE *Aspergillus oryzae* IPT-301 EM ESPONJA VEGETAL PARA A SÍNTESE ENZIMÁTICA DE FRUTO-OLIGOSSACARÍDEOS

O Presidente da banca examinadora abaixo assina a aprovação da Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestra em Engenharia Química pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Engenharia Química.

Aprovada em: 23 de agosto de 2024.

Prof. Dr. Rafael

Firmani Perna

Presidente da Banca

Examinadora

Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Profa. Dra. Gisella Maria Zanin

Instituição: : Universidade Estadual de Maringá

Prof. Dr. Rodrigo Correa Basso

Instituição: Universidade Federal de Alfenas



Documento assinado eletronicamente por **Rafael Firmani Perna, Professor do Magistério Superior**, em 23/08/2024, às 15:29, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1317322** e o código CRC **AEC8D521**.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, que através dos dons do seu Espírito Santo me concedeu sabedoria, entendimento, conselho, fortaleza e ciência, para o desenvolvimento e realização deste trabalho.

À minha mãe Rosângela, que contribuiu diretamente na minha formação profissional e pessoal, sem medir esforços. Agradeço a confiança que sempre depositou em mim.

Ao meu amado esposo Alexandre, o meu maior incentivador, por toda paciência, amor, carinho e compreensão durante as difíceis horas de dedicação a este trabalho.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Rafael Firmani Perna, pela sabedoria e todo o grande conhecimento compartilhado.

As queridas alunas de iniciação científica, Eva Abreu e Gabriela Ruiz, por todo apoio prestado durante os experimentos.

Ao Laboratório de Biotecnologia Industrial do Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo (IPT/SP) pelo fornecimento da cepa microbiana.

Ao Grupo de Pesquisa em Tecnologia Enzimática e Bioprocessos por todo auxílio.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pela concessão da bolsa e pelo financiamento deste projeto de pesquisa (Processo BPD-00030-22).

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

RESUMO

Fruto-oligosacarídeos (FOS) são classificados como açúcares prebióticos que apresentam diversos benefícios à saúde e nutrição humana. São sintetizados industrialmente, por reação de transfrutossilacção em moléculas de sacarose catalisadas por enzimas frutossiltransferases aderidas às células microbianas. A imobilização de células em materiais de suporte possibilita obter biocatalisadores heterogêneos robustos e resistentes às condições adversas do meio reacional. Esponjas vegetais são suportes indicados para a imobilização por apresentarem tamanho e distribuição de poros que possibilitam a difusão gasosa e de substrato, essenciais para o crescimento microbiano. Além disso, são suportes biodegradáveis e de baixo custo. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi avaliar a produção de células de *Aspergillus. oryzae* IPT-301 e sua imobilização em esponja vegetal. Para isso, a produção das células microbianas, imobilizadas em esponja vegetal, ocorreu em meio de cultura sintético, pH 5,5, 200 rpm à 30 °C. A curva de crescimento microbiano mostrou que o melhor tempo de cultivo celular ocorreu para 28h de processo. A temperatura de 50 °C, o pH de 5,75 e a concentração de 400 g L⁻¹ foram os parâmetros do meio reacional que forneceram máximas atividades enzimáticas. As células biocatalíticas imobilizadas exibiram maior termoestabilidade quando comparadas às células biocatalíticas *in natura*, conforme indicado pelos valores dos parâmetros termodinâmicos obtidos para o biocatalisador heterogêneo. Além disso, as células imobilizadas em esponja vegetal apresentaram ampla faixa de estabilidade frente ao pH (5,00 a 7,00) e bom desempenho operacional. Ensaio em reator de leito fixo mostraram uma produtividade enzimática de 11,7 U g⁻¹ min⁻¹, cujos valores de conversão e rendimento obtidos foram iguais a 8,31% e 6,63%, respectivamente. Quanto ao valor do parâmetro produtividade mássica, obteve-se 1,89 g FOS g_{células}⁻¹ h⁻¹ para o sistema reacional contínuo. Esse conjunto de resultados evidencia a inovação tecnológica presente neste estudo para a obtenção de biocatalisadores a partir da imobilização de células em esponja vegetal, tanto para a síntese de FOS, quanto no avanço do segmento de bioprodutos de interesse industrial e na implementação de bioprocessos diversos.

Palavras-Chave: *Aspergillus oryzae*; esponja vegetal; imobilização; células biocatalíticas; frutossiltransferase.

ABSTRACT

The fructooligosaccharides (FOS) are classified as prebiotic sugars that have several benefits for human health and nutrition. They are synthesized industrially, due to the occurrence of transfructosylation in sucrose molecules catalyzed by fructosyltransferase enzymes (FTases, E.C.2.4.1.9) adhered to microbial cells. The immobilization of cells on support materials makes it possible to obtain biocatalysts that are heterogeneous, robust and resistant to adverse conditions in the reaction medium. The loofa sponges are suitable supports for immobilization because they have a size and distribution of pores that enable gaseous and substrate diffusion, essential for microbial growth. Furthermore, they are biodegradable and low cost. Therefore, the objective of this work was to evaluate the production of *A. oryzae* IPT-301 cells, by submerged cell culture, and their concomitant immobilization in a loofa sponge. For this, the production of microbial cells, immobilized in loofa sponge, occurred in synthetic culture medium, pH 5.5, 200 rpm at 30 °C. The microbial growth curve showed that the best cell culture time occurred during the 28h process. The temperature of 50 °C, the pH of 5.75 and the concentration of 400 g L⁻¹ were the parameters of the reaction medium that provided maximum enzymatic activities. The immobilized biocatalytic cells exhibited greater thermostability when compared to the *in natura* biocatalytic cells, as indicated by the values of the thermodynamic parameters obtained for the heterogeneous biocatalyst. Furthermore, cells immobilized in loofa sponge have a wide range of pH stability (5.00 to 7.00) and good operational performance. Tests in a packed bed reactor demonstrated an enzymatic productivity of 11.7 U g⁻¹ min⁻¹, whose conversion and yield values obtained were equal to 8.31% and 6.63%, respectively. Regarding the value of the maximum productivity parameter, we obtained 1.89 g FOS g_{cells}⁻¹ h⁻¹ for the continuous reaction system. This set of results obtained highlights the technological innovation present in this study to obtain biocatalysts from the immobilization of cells in loofa sponge, both for the synthesis of FOS, as well as in the advancement of the segment of bioproducts of industrial interest and in the implementation of diverse bioprocesses.

Keywords: *Aspergillus oryzae*; loofa sponge; immobilization; biocatalytic cells; fructosyltransferase.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Moléculas de sacarose, kestose, nistose e β -frutofuranosilnistose	17
Figura 2 -	Reação de transfrutossilacção da sacarose pela FTase.....	22
Figura 3 -	Métodos de imobilização celular	24
Figura 4 -	Esponja vegetal em formato de cubos de 1,0 cm de aresta para a imobilização de células biocatalíticas de <i>A. oryzae</i> IPT-301	32
Figura 5 -	Pré-tratamento da esponja vegetal para uso como material de suporte	33
Figura 6 -	Sequência utilizada para produção e imobilização das células.....	35
Figura 7 -	Imagens de microscopia eletrônica de varredura.....	44
Figura 8 -	Curva TG/DSC da esponja vegetal	46
Figura 9 -	Influência do tempo de cultivo microbiano nas atividades de transfrutossilacção de células de <i>A. oryzae</i> IPT-301 imobilizadas em esponja vegetal	49
Figura 10 -	Células de <i>A. oryzae</i> IPT-301 imobilizadas em esponja vegetal	51
Figura 11 -	Progressão do pH do meio de cultura em função do tempo de cultivo celular.....	52
Figura 12 -	Diagrama de Pareto para a variável resposta “atividade relativa” para as células de <i>A. oryzae</i> IPT-301 imobilizadas em esponja vegetal	55
Figura 13 -	Superfície de resposta e curvas de contorno em função do pH e da temperatura do meio reacional.....	58
Figura 14 -	Influência da concentração do substrato na atividade enzimática de células biocatalíticas de <i>A. oryzae</i> IPT-301 imobilizadas em esponja vegetal.....	59
Figura 15 -	Perfis de estabilidade térmica das células biocatalíticas de <i>A. oryzae</i> IPT-301, <i>in natura</i> (A) e imobilizadas (B), ao decorrer de 36 horas de incubação para diferentes temperaturas (30 °C, 40 °C, 50 °C e 60 °C)	61
Figura 16 -	Determinação da energia de desativação térmica (E_D)	63
Figura 17 -	Determinação da energia de desativação térmica (E_D)	64
Figura 18 -	Estabilidade enzimática de células biocatalíticas de <i>A. oryzae</i> IPT-301, <i>in natura</i> e imobilizadas em esponja vegetal, após 24 h de incubação a 4 °C para diferentes valores de pH	68
Figura 19 -	Estabilidade operacional de células biocatalíticas de <i>A. oryzae</i> IPT-301 imobilizadas em esponja vegetal durante ciclos reacionais consecutivos em batelada	70
Figura 20 -	Estabilidade de armazenamento de células biocatalíticas de <i>A. oryzae</i> IPT-301 imobilizadas em esponja vegetal.	72

Figura 21 –	Perfil de atividade enzimática das células de <i>A. oryzae</i> IPT-301, imobilizadas em esponja vegetal, em reator de leito fixo	74
Figura 22 -	Curva de calibração obtida pelo método DNS (ácido 3,5-dinitrosilicílico) para a determinação da concentração de açúcares redutores.....	93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Matriz de Planejamento Experimental.....	36
Tabela 2 -	Massa por unidade de área para esponja vegetal	47
Tabela 3 -	Resistência a tração e alongamento da esponja vegetal para os corpos de prova avaliados	47
Tabela 4 -	Resistência a tração e alongamento médios da esponja vegetal	48
Tabela 5 -	Matriz do Delineamento do tipo Composto Central Rotacional.....	53
Tabela 6 -	Efeitos estimados, erro padrão e <i>p-valor</i> para avaliação dos efeitos do pH e temperatura do meio reacional na atividade de transfrutossilação das células de <i>A. oryzae</i> IPT-301 imobilizadas em esponja vegetal	55
Tabela 7 –	Resultado da Análise de Variância (ANOVA) para o modelo estatístico com interação para a avaliação dos efeitos de pH e Temperatura do meio reacional na atividade de transfrutossilação das células de <i>A. oryzae</i> IPT-301 imobilizadas em esponja vegetal.....	56
Tabela 8 -	Parâmetros termodinâmicos obtidos para as células biocatalíticas de <i>A. oryzae</i> IPT-301, <i>in natura</i> e imobilizada em esponja vegetal, obtidos para diferentes temperaturas de incubação	65

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	OBJETIVOS	15
2.1	GERAL.....	15
2.2	ESPECÍFICOS	15
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
3.1	FRUTO-OLIGOSSACARÍDEOS (FOS).....	16
3.1.1	Definição, estrutura e síntese	16
3.1.2	Benefícios e aplicações	18
3.2	FRUTOSILTRANSFERASE	20
3.2.1	Atividade de Transfrutossilacção	21
3.3	IMOBILIZAÇÃO DE CÉLULAS MICROBIANAS COM ATIVIDADE ENZIMÁTICA	22
3.3.1	Métodos de Imobilização Celular	24
3.3.2	Suporte de Imobilização	26
3.3.3	Células biocatalíticas imobilizadas	29
4	MATERIAIS E MÉTODOS	31
4.1	MATERIAIS	31
4.2	MÉTODOS.....	31
4.2.1	Síntese do biocatalisador heterogêneo	31
4.2.1.1	Microrganismo, condições de cultivo e preparo do inóculo	31
4.2.1.2	Preparo do material de suporte.....	32
4.2.1.3	Ensaio de caracterização do material de suporte (esponja vegetal).....	33
4.2.2	Produção e imobilização das células biocatalíticas	34
4.2.3	Construção das curvas de crescimento microbiano	35
4.3	CARACTERIZAÇÃO DAS PROPRIEDADES BIOQUÍMICAS DO BIOCATALISADOR HETEROGÊNEO.....	36
4.3.1	Influência da temperatura e pH do meio reacional na atividade enzimática	36
4.3.2	Influência da concentração de substrato na atividade enzimática	37
4.3.3	Ensaio de estabilidade térmica e obtenção dos parâmetros termodinâmicos	37
4.3.4	Ensaio de estabilidade do biocatalisador frente ao pH de incubação	39

4.3.5	Ensaio de estabilidade operacional em modo batelada.....	39
4.3.6	Ensaio de estabilidade de armazenamento	39
4.3.7	Avaliação da eficiência das células biocatalíticas imobilizadas em sistema reacional contínuo	39
4.4	MÉTODOS ANALÍTICOS.....	40
4.4.1	Determinação das atividades enzimáticas em modo batelada.....	40
4.4.2	Quantificação dos açúcares	41
4.4.2.1	Determinação da concentração de açúcares redutores	41
4.4.2.2	Determinação da concentração de glicose.....	42
4.4.2.3	Quantificação de sacarose e fruto-oligossacarídeos	43
4.5.	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	43
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
5.1	CARACTERIZAÇÃO DO BIOCATALISADOR HETEROGÊNEO	44
5.1.1	Microscopia eletrônica de varredura	44
5.1.2	Área superficial específica, porosidade e umidade do material de suporte	45
5.1.3	Dados Termogravimétricos	45
5.1.4	Determinação da massa por unidade de área	47
5.1.5	Ensaio mecânicos	47
5.2	CURVA DE CRESCIMENTO MICROBIANO E MONITORAMENTO DO PH DO MEIO DE CULTURA.....	48
5.3	CARACTERIZAÇÃO DAS PROPRIEDADES BIOQUÍMICAS DAS CÉLULAS MICROBIANAS MOBILIZADAS	52
5.3.1	Otimização da temperatura e do pH do meio reacional na atividade enzimática	53
5.3.2	Influência da concentração de substrato na atividade enzimática	58
5.3.3	Estabilidade térmica e obtenção dos parâmetros termodinâmicos	60
5.3.4	Estabilidade das células biocatalíticas frente ao pH de incubação	67
5.3.5	Estabilidade Operacional	69
5.3.6	Estabilidade de armazenamento do biocatalisador heterogêneo	71
5.3.7	Avaliação do desempenho do biocatalisador heterogêneo em reator de leito fixo	73
6	CONCLUSÃO	76
7	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	77
	REFERÊNCIAS	78
	APÊNDICE A - Curva de Calibração para Determinação de Açúcar Redutor	93

1 INTRODUÇÃO

Cada vez mais, observa-se o aumento dos cuidados com a saúde pela população humana, despertando na indústria a necessidade de alimentos mais saudáveis e com baixo valor calórico (Correa *et al.*, 2024). Os fruto-oligossacarídeos (FOS) representam, atualmente, a melhor alternativa como açúcares prebióticos com inúmeros benefícios para a saúde e nutrição humana e animal e, portanto, tem recebido cada vez mais atenção por parte de pesquisadores e indústrias, principalmente farmacêuticas e alimentícias (Cunha *et al.*, 2019; Gonçalves *et al.*, 2020).

Esses prebióticos são açúcares, de baixa caloria, não cariogênicos, podem ser consumidos seguramente por diabéticos, aumentam a absorção de cálcio e magnésio pelo organismo humano e, por não serem hidrolisados pelas enzimas gastrointestinais, promovem a seletividade bacteriana na microbiota intestinal, auxiliando na eliminação de microrganismos patogênicos e na prevenção do câncer de cólon (Drabińska; Krupa-Kozak; Jarocka-Cyrta, 2020; Mutanda *et al.*, 2014; Rajagopalan; Krishnan, 2018). Os FOS auxiliam ainda na redução dos níveis séricos totais de colesterol e no tratamento de doenças como a anemia, hipertensão arterial e insuficiência renal (Correa *et al.*, 2024).

Os FOS ocorrem naturalmente em uma grande quantidade de vegetais e podem ser encontrados em mais de 36 mil espécies de plantas (Mussatto; Mancilha, 2007), cujas fontes naturais de obtenção mais conhecidas são: cebola, alho, aspargos, banana, alcachofra, tomate, chicória, dentre outros (Cunha *et al.*, 2019). Comercialmente os FOS podem ser sintetizados por meio de processos químicos, físicos ou enzimáticos, sendo mais comumente empregado em escala industrial os métodos enzimáticos (Mutanda *et al.*, 2014).

A produção de FOS ocorre mediante a reação de transfrutossilacção de moléculas de sacarose catalisadas por enzimas de origem microbiana como as frutossiltransferases (FTase, E.C.2.4.1.9), as quais apresentam elevada atividade de transfrutossilacção (Cunha *et al.*, 2019; Garcia *et al.*, 2021; Gonçalves *et al.*, 2020; Maiorano *et al.*, 2008; Perna *et al.*, 2018). O fungo *Aspergillus oryzae* IPT-301 tem sido reportado como fonte potencialmente produtora da FTases, com elevada atividade de transfrutossilacção, dentre as dezessete linhagens de fungos filamentosos avaliadas (Fernandez *et al.*, 2007).

Em 2022, o mercado mundial de FOS atingiu valor de US\$ 2,59 bilhões, e espera-se ainda uma taxa de crescimento anual de 8,8% até 2030 alcançando US\$ 5,09 bilhões (Rawat *et al.*, 2024), fator que torna a produção industrial atrativa para esse açúcar nutracêutico. No

entanto, o Brasil ainda não possui tecnologia eficaz para a sua produção em larga escala que, atualmente, é suprida por importações. Os custos relacionados à produção enzimática e ao rendimento reacional continuam desafiadores frente ao escalonamento do processo. O uso de enzimas requer a recuperação e a reutilização destas para tornar o processo economicamente viável. A produção de FOS com FTase solúvel, mediante biocatálise homogênea, pode gerar altos custos de síntese e purificação da enzima, instabilidade da sua estrutura tridimensional quando isolada do seu ambiente natural e possível perda de atividade devido às condições do processo ou inibição pelo substrato e/ou produto. Além disso, as enzimas solúveis contaminam o produto desejado e muitas vezes não podem ser recuperadas do meio reacional em sua forma ativa (Souza *et al.*, 2017).

Dessa forma, a imobilização de células surge como estratégia para contornar problemas relacionados à instabilidade para aplicação em larga escala de bioprocessos enzimáticos. Ressalta-se ainda que, a imobilização de células é considerada mais vantajosa que a de enzimas visto que não necessita das etapas de extração, precipitação e purificação prévia da proteína, já que utiliza a própria estrutura celular como suporte natural da enzima (Ganaie; Lateef; Gupta, 2014). Tais características permitem uma grande vantagem operacional quando comparado ao uso de enzimas (Canilha; Carvalho; Silva, 2006). A imobilização consiste em confinar, física ou quimicamente, células microbianas a um suporte sólido insolúvel em meio aquoso ou solvente orgânico, obtendo-se um biocatalisador heterogêneo com elevada especificidade, seletividade e estabilidade (Dwevedi, 2016). Essa técnica ainda é capaz de promover aumentos expressivos de atividade e estabilidade do biocatalisador heterogêneo quanto à estocagem a qual, geralmente, é superior à da enzima solúvel (Martinez *et al.*, 2016)

Em meio aos numerosos métodos e suportes disponíveis, este trabalho propôs utilizar um suporte inovador, a esponja vegetal, pois além de ser encontrada em abundância no Brasil, é um material altamente poroso, de baixo custo e tem características estruturais que podem reduzir a tensão e dificuldade na passagem de ar e nutrientes entre as células e o sistema (IQBAL *et al.*, 2005). Trabalhos encontrados na literatura reportaram grande sucesso no uso de esponja vegetal como suporte (Martinez *et al.*, 2016; Mussatto *et al.*, 2012; Zdarta; Jesionowski, 2016).

Diante disso, visando o aumento e otimização na produção de FOS, principalmente no mercado interno, para atender a sua crescente demanda comercial, este estudo aborda a produção de biocatalisador heterogêneo inédito para a síntese de FOS mediante a imobilização de células de *A. oryzae* IPT-301 em suporte durante o cultivo celular submerso em meio de

cultura sintético. Buscou-se obter um biocatalisador robusto que apresente expressivas atividade, seletividade e especificidade, além de elevada estabilidade, especialmente térmica e operacional, de modo a ser empregado em diferentes configurações de reatores, para a síntese de FOS, operados nos modos batelada e contínuo. Ressalta-se que estes foram os primeiros resultados alcançados para células de *Aspergillus oryzae* IPT-301, com atividade de transfrutoseilação, imobilizada em esponja vegetal.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Produzir e imobilizar células de *Aspergillus oryzae* IPT-301 em esponja vegetal durante o cultivo submerso e caracterizá-las quanto às suas propriedades bioquímicas e de estabilidade visando obter um biocatalisador heterogêneo ativo e estável para a síntese de fruto-oligossacarídeos (FOS).

2.2 ESPECÍFICOS

- **Quanto a síntese do biocatalisador heterogêneo**
 - a) Produzir células biocatalíticas de *A. oryzae* IPT-301 e imobilizá-las em esponja vegetal durante o cultivo celular submerso em meio de cultura sintético;
 - b) Determinar a capacidade de crescimento das células biocatalíticas na esponja vegetal em função do tempo de cultivo e da atividade enzimática mediante a avaliação da curva de crescimento microbiano;
 - c) Caracterizar o suporte orgânico nas condições *in natura* e com as células biocatalíticas imobilizadas visando comprovar seu potencial como material para imobilização.

- **Quanto aos estudos de caracterização das propriedades bioquímicas e de estabilidade do biocatalisador heterogêneo**
 - a) Avaliar os efeitos da temperatura, do pH e da concentração de substrato do meio reacional na atividade de transfrutossilacção do biocatalisador heterogêneo;
 - b) Avaliar as estabilidades térmica, de armazenamento e frente ao pH de incubação do biocatalisador, assim como estimar seus parâmetros termodinâmicos;
 - c) Monitorar o desempenho do biocatalisador em ciclos consecutivos em batelada e em reator de leito fixo para avaliação da sua estabilidade operacional e obtenção dos parâmetros de desempenho na síntese de FOS.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 FRUTO-OLIGOSSACARÍDEOS (FOS)

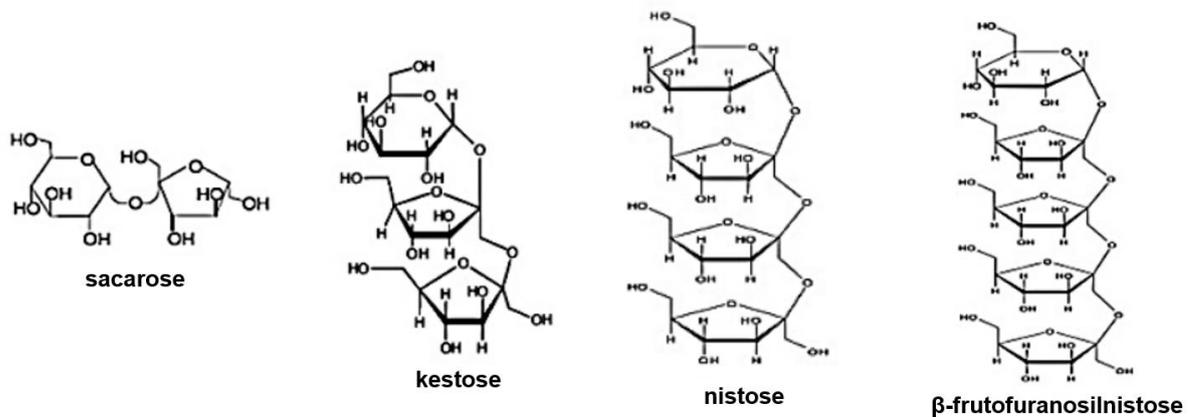
3.1.1 Definição, estrutura e síntese

As fibras são carboidratos não digeríveis e podem ser classificadas de acordo com suas características botânicas, químicas e fisiológicas. Nessa classe, destacam-se os frutanos, que são polímeros naturais formados por frutose, ligada ou não a uma molécula terminal de sacarose. Os frutanos podem ser classificados em levanas (polímeros lineares com ligações glicosídicas $\beta(2\rightarrow6)$), compostos ramificados (polímeros que possuem ligações tipo $\beta(2\rightarrow6)$ e $\beta(2\rightarrow1)$) e inulina (polímero linear com ligações glicosídicas $\beta(2\rightarrow1)$) (Correa *et al.*, 2024, Macedo; Vimercati; Araújo, 2020).

As principais classes de frutanos são: as inulinas que podem formar polímeros (com um grau de polimerização (GP) igual ou superior a 10) e os chamados fruto-oligossacarídeos (FOS) ou oligofrutoses, que consistem em oligômeros (com GP entre 3 e 9) (Septiyani; Wijanarka; Nurhayati, 2023).

De acordo com Saad (2006) e Roberfroid (2007), oligofrutoses e FOS são termos sinônimos. Entretanto, na literatura, o termo oligofrutose é comumente utilizado para descrever inulinas de cadeia curta enquanto FOS é majoritariamente empregado para denominar frutanos de cadeia curta obtidos por meio de moléculas de sacarose (Huang *et al.*, 2016). As cadeias de FOS são constituídas de uma molécula de sacarose alongada por uma cadeia de unidades frutossil, conectadas por meio de ligações glicosídicas do tipo $\beta(2,1)$, possuindo um formato genérico do tipo GF_n (em que G se refere à molécula de glicose, F de frutose e *n* ao número de unidades do grupo frutossil) (Garcia *et al.*, 2021). Os FOS são encontrados, principalmente, na forma de kestose, nistose e β -frutofuranosilnistose (Michel *et al.*, 2016) e suas respectivas estruturas moleculares podem ser observadas na Figura 1.

Figura 1 - Moléculas de sacarose, kestose, nistose e β -frutofuranosilnistose



Fonte: Cunha (2017, p. 18).

Os FOS ocorrem naturalmente em uma grande quantidade de vegetais e podem ser encontrados em mais de 36 mil espécies de plantas (Mussatto; Mancilha, 2007). Porém, nem todas são viáveis para fins alimentícios, sendo que as fontes mais conhecidas são: cebola, alho, aspargos, alcachofra, tomate, banana, chicória, dentre outras (Cunha *et al.*, 2019). Contudo, o rendimento da produção de FOS proveniente do uso de enzimas oriundas de plantas é limitado devido às condições sazonais (Macedo *et al.*, 2021).

Comercialmente os FOS podem ser sintetizados por meio de processos químicos e físicos, porém os métodos enzimáticos são mais comumente empregado em escala (Mutanda *et al.*, 2014). A obtenção de FOS pelo método enzimático se dá por meio de três principais vias: (i) hidrólise da inulina realizada pelas enzimas inulinasas; (ii) reação de transfrutossilação da sacarose realizada pela enzima frutossiltransferase (FTase); ou (iii) ação de enzimas β -frutofuranosidases (FFase) que hidrolisam o terminal não-redutor da sacarose (Belmonte-Izquierdo *et al.*, 2023)

Para a produção industrial de FOS deve-se obter a triagem de microrganismos que produzem alta atividade enzimática (Karkeszová; Polakovič, 2023). Estudos mostram que dentre os possíveis microrganismos produtores de frutossiltransferases, o fungo *A. oryzae* destaca-se como o mais promissor para a produção da enzima em escala industrial (Fernandez *et al.*, 2007; Maiorano *et al.*, 2008).

As principais características dos FOS comerciais estão associadas ao baixo valor energético (2 kcal/g) com poder adoçante de 40% a 60% comparado ao da sacarose e estes não diferem dos FOS encontrados naturalmente nos alimentos (Khuenpet *et al.*, 2015; Santos-

Moriano *et al.*, 2015). É possível verificar na literatura que a viscosidade dos FOS, quando em solução, e sua estabilidade térmica são superiores ao da sacarose, para a mesma proporção, além de serem estáveis em faixa de pH ente 4 e 7 (Ureta *et al.*, 2019). Além disso, por serem não redutores, não são susceptíveis a *reação de Maillard* e caramelização (Sethupathy *et al.*, 2020).

Devido à escassez da ocorrência natural destes produtos e pela forma de produção dos compostos FOS, esses oligômeros são comercializados com preços significativamente elevados. Em 2008, o valor de mercado dos FOS foi de cerca de 4 €.kg⁻¹. Já em 2019, este valor saltou para aproximadamente 150 €.kg⁻¹. A produção mundial de FOS também em 2019 foi em torno de 167 mil toneladas, com valor equivalente a 390 milhões de euros (Bedzo; Mandegari; Görgens, 2019). Em 2022, o mercado mundial de FOS atingiu valor de US\$ 2,59 bilhões, e espera-se ainda uma taxa de crescimento anual de 8,8% até 2030 alcançando US\$ 5,09 bilhões (Rawat *et al.*, 2024).

3.1.2 Benefícios e aplicações

De acordo com Ribeiro *et al.* (2022), um alimento pode ser considerado prebiótico, se ele for resistente à acidez gástrica, não sofrer hidrólise por enzimas de mamíferos e não ser absorvido pelo trato gastrointestinal, bem como favorecer o crescimento de bactérias intestinais benéficas à saúde humana. Os FOS são classificados como prebióticos e fibras solúveis, visto que são componentes alimentares que não sofrem hidrólise pelas enzimas no trato digestivo, chegando intactos ao intestino grosso, e só então, são seletivamente fermentados, levando à produção de ácido láctico e ácidos graxos de cadeia curta, com consequente diminuição do pH no intestino grosso, o que favorece o crescimento de bactérias benéficas ao cólon, como bifidobactérias e lactobacilos (Macedo; Vimercati; Araújo, 2020), ao mesmo tempo que reduz ou evita a proliferação de populações microbianas patogênicas, como *Clostridium spp.* e *Escherichia coli* (Caetano *et al.*, 2016). Dessa forma, previne o câncer de cólon (Dias *et al.*, 2022).

Fibras prebióticas, como FOS, inulina e mananoligossacarídeos (MOS), foram incorporados ao leite desnatado para avaliar seu impacto na microbiota intestinal do ser humano. A adição de FOS ao leite obteve os melhores resultados, uma vez que modulou positivamente a microbiota intestinal promovendo o crescimento de microrganismos benéficos como *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (Correa *et al.*, 2024).

Lobo, Colli e Filisetti, (2006) analisaram durante seus experimentos que houve um aumento da absorção de cálcio e magnésio, ao ministrarem FOS 5% em ratos, evidenciando, portanto, um importante benefício do oligômero na manutenção da saúde dos ossos. Avaliaram também os efeitos do FOS sobre o estado nutricional de ferro e zinco, e biomarcadores de resposta imune em crianças em idade pré-escolar, comprovando que o FOS melhorou a resposta imune intestinal.

Os FOS ainda apresentam baixos valores de consumo calórico (2,0 kcal/g) e baixo índice glicêmico, pois não são usados como fontes de energia no corpo humano, reduz ainda a permeabilidade intestinal e, assim, a sensibilidade à insulina, sendo um alimento seguro para pacientes diabéticos e pré-diabéticos (Correa *et al.*, 2024). O consumo de FOS é também considerado uma ferramenta nutricional valiosa pois auxiliam no controle do colesterol e na prevenção da anemia, obesidade, osteoporose, hipertensão, intolerância à lactose, insuficiência renal e câncer gastrointestinais (Drabińska; Krupa-Kozak; Jarocka-Cyrta, 2020; Rajagopalan; Krishnan, 2018). Existem ainda estudos que comprovam que os FOS são anticariogênicos, ou seja, não são assimilados por *Streptococcus mutans* para a geração de ácidos e β -glucanos insolúveis, responsáveis pela formação de cáries dentárias (Mutanda *et al.*, 2014).

FOS mostrou-se ainda um aliado na redução da pressão arterial em portadores de hipertensão e é considerado benéfico, pois está associado ao aumento da digestão e metabolização da lactose, aumento da síntese de vitaminas (principalmente as do complexo B), diminuição do crescimento de bactérias nocivas e toxinas, redução do potencial de patologias como doenças autoimunes, câncer, acne, cirrose hepática, constipação, intoxicação alimentar, diarreia associada à utilização de antibióticos, problemas digestivos, alergias e intolerâncias a alimentos e gases intestinais (Caetano *et al.*, 2016).

Além dos benefícios já demonstrados, a suplementação alimentar com frutanos tem se mostrado uma ferramenta importante para pacientes com doença celíaca recém-diagnosticada (Correa *et al.*, 2024). Drabińska, Krupa-Kozak e Jarocka-Cyrta (2020) conduziram um estudo piloto para examinar os efeitos do FOS em vitaminas em crianças celíacas submetidas a uma dieta sem glúten e observaram aumento de vitamina D e vitamina E.

Em relação à aplicação na indústria alimentícia, o FOS tem tido mais sucesso quando aplicado como substituto da sacarose e de ingrediente prebiótico (Correa *et al.*, 2024), visto que tem sabor neutro e estabilidade ao longo de uma ampla faixa de pH e temperatura (Alves *et al.*, 2020; Angiolillo; Conte; Del Nobile, 2015; Arruda *et al.*, 2022), e se combinado com edulcorantes de alta intensidade, fornecendo um perfil de sabor balanceado, reduzindo o sabor

residual (Gonzalez-Tomás; Coll-Marqués; Costell, 2008). A indústria de laticínios tem desempenhado um papel de liderança no desenvolvimento funcional de alimentos, pois vários produtos lácteos foram enriquecidos com FOS e inulina para melhorar seus benefícios à saúde e nutrição humana, entre os principais destacam-se, iogurtes, bebidas de soro de leite, queijos e sorvetes (Correa *et al.*, 2024). Há ainda a possibilidade de serem empregados em alimentação animal, ou em uso cosmético e farmacêutico (Mutanda *et al.*, 2014).

Apesar de todos estes benefícios, é importante atentar-se à quantidade consumida. De acordo com Kuthiala *et al.* (2021), efeitos positivos de ingestão de FOS são alcançados com doses de 20 gramas/dia para adultos e 4,2 gramas/dia para bebês com menos de um ano de idade. Acima desses valores, os indivíduos podem sentir inchaço, cólicas estomacais, diarreia e gases intestinais.

3.2 FRUTOSILTRANSFERASE

Para a produção de FOS as células podem ser de origem vegetal quanto de origem fúngica, porém, o rendimento na produção utilizando células originadas de plantas é relativamente baixo e a produção em massa é limitada pelo fator sazonalidade. Esta é a principal razão pelo qual a produção industrial de FOS depende principalmente de células derivadas de fungos (Macedo *et al.*, 2021).

A enzima frutossiltransferase (FTase), é classificada como uma transferase (Iubmb, 2021) e é responsável por catalisar as reações de transferência de grupos frutossil para a molécula de sacarose, sintetizando fruto-oligossacarídeos (FOS) como principal produto (Choukade; Kango, 2019; Cunha *et al.*, 2019; Gonçalves *et al.*, 2020). As FTases são enzimas que possuem alta atividade de transfrutossilção e rendimentos para a produção de FOS a partir da sacarose de aproximadamente 57 %, para altas concentrações do substrato (Karkeszová; Polakovič, 2023).

A atividade de transfrutossilção das FTases se deve a sua ação na clivagem da ligação glicosídica β (2 \rightarrow 1) da molécula de sacarose, o que resulta na transferência de uma molécula de frutose para um aceptor, que pode ser outra molécula de sacarose, o que leva a formação de FOS e a liberação de uma molécula de glicose no meio reacional (Cunha *et al.*, 2019; Guan *et al.*, 2017; Pereira, 2021). Perna *et al.* (2018) relataram que, embora várias publicações na literatura apresentem dados sobre a produção de FTases e suas fontes microbianas, há escassez de trabalhos sobre sua produção em escala piloto.

A FTase é produzida por vários microrganismos incluindo bactérias e fungos (MICHEL *et al.*, 2016). Na literatura, diversos autores reportam os seguintes micro-organismos por possuírem espécies e cepas capazes produzir FTase: *Aureobasidium*, *Arthrobacter*, *Aspergillus*, *Bacillus*, *Candida*, *Claviceps*, *Cryptococcus*, *Fusarium*, *Lactobacillus*, *Penicillium*, *Phytophthora*, *Rhizopus*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Scopulariopsis*, *Sporotrichum*, *Streptococcus*, *Xanthophyllomyces* e *Zymomonas* (Cunha *et al.*, 2019; Ganaie; Lateef; Gupta, 2014; Guan *et al.*, 2017; Mutanda *et al.*, 2014).

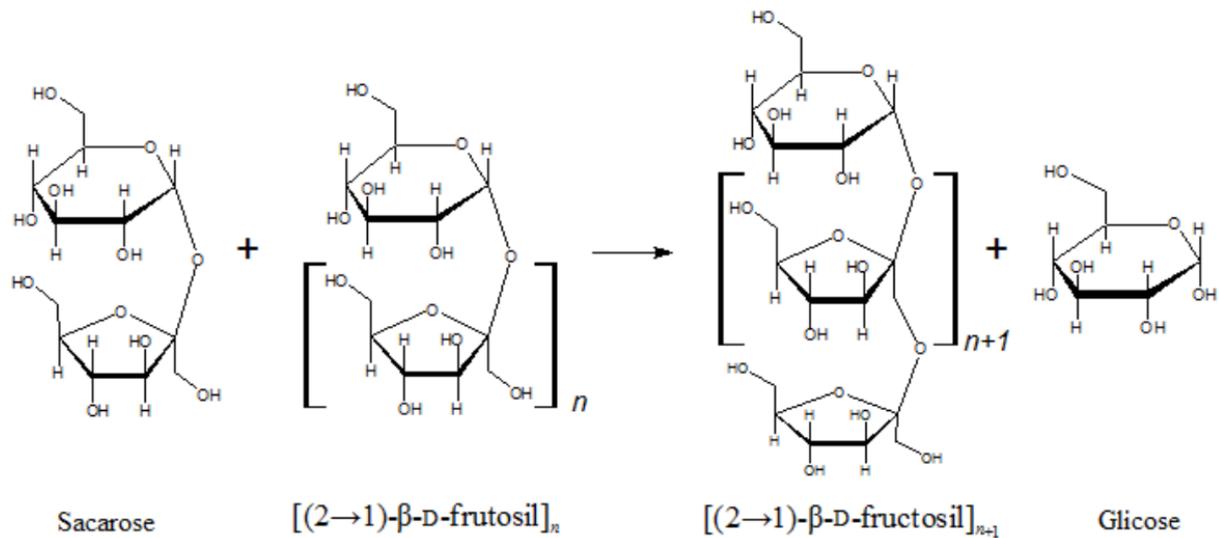
Os microrganismos mais investigados na produção de FOS são o *Aspergillus japonicus* e o *Aspergillus niger* (Lateef *et al.*, 2012; Mussatto *et al.*, 2009; Sheu *et al.*, 2013). Entretanto, estudos realizados por Fernandez *et al.* (2007) mostraram que a FTase presente nas células microbianas de *Aspergillus oryzae* IPT-301 apresentou maior atividade de transfrutoseilação e, portanto, um maior potencial para a produção de FOS, entre as dezessete cepas de fungos filamentosos investigadas.

O efeito da composição do meio, temperatura, pH, umidade inicial do substrato, concentração de inóculo e porosidade do suporte são de importância essencial para o desenvolvimento de bioprocessos. Em um sentido geral, o aumento da produtividade está relacionado à otimização do meio (Rigo *et al.*, 2021). Ottoni *et al.* (2012) investigaram a composição do meio de cultura visando otimizar a produção de enzimas com elevada atividade de transfrutoseilação a partir do cultivo de *Aspergillus oryzae* IPT-301 em agitadores orbitais tipo shaker, e reportaram a sacarose como a melhor dentre as fontes de carbono analisadas, verificando que sua concentração tem influência direta na produção de biomassa e na atividade enzimática.

3.2.1 Atividade de Transfrutoseilação

A reação de transfrutoseilação da sacarose está esquematizada na Figura 2, em que as moléculas de frutose são transferidas para a posição β -(2 \rightarrow 1) da molécula de sacarose, que conecta o grupo glicosil ao grupo frutossil, catalisada pela FTase, levando à formação de FOS e à liberação de glicose (Ribeiro *et al.*, 2022).

Figura 2 - Reação de transfrutossilação da sacarose pela FTase



Fonte: Cunha (2017, p. 18).

Definições distintas para a atividade de transfrutossilação são encontradas na literatura. Fernandez *et al.* (2007) e Ottoni *et al.* (2012) definiram a atividade de transfrutossilação como a quantidade de enzima que produz um micromol de FOS por minuto nas condições experimentais adotadas. Chen e Liu (1996), Ganaie, Lateef e Gupta (2014) e Hayashi (1992) a definiram como a quantidade de enzima necessária para liberar um micromol de glicose por minuto. Cunha *et al.* (2019), Faria *et al.* (2021) e Gonçalves *et al.* (2020), utilizaram a definição para a atividade de transfrutossilação como a quantidade de enzima que transfere um micromol de frutose por minuto nas condições experimentais adotada.

3.3 IMOBILIZAÇÃO DE CÉLULAS MICROBIANAS COM ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A imobilização de células é definida como a fixação de células em uma matriz inerte e, preferencialmente, de elevada área específica de forma a restringir o movimento celular, mas que seja suficientemente porosa para permitir a difusão de produtos e substratos, visando aumentar a estabilidade da célula e possibilitar sua utilização como biocatalisador (Krasňan *et al.*, 2016).

O emprego de enzimas solúveis apresenta altos custos de produção e purificação, instabilidade, redução de atividade devido às condições do processo e inibição pelo substrato ou produto, implicando dessa forma, em um tempo de meia-vida operacional curto (Ashkan *et*

al., 2021). Ainda, tem-se a presença de enzimas como parte integrante do meio (se não houver uma etapa de separação da enzima, o que em muitos casos pode gerar *off flavor* em alimentos e medicamentos, por conter traços da enzima no produto final, e ainda, ser um fator de risco, pois pode desencadear reações alérgicas ao consumidor final, no caso de alimentos, medicamentos e bebidas (Aguiar-Oliveira; Maugeri, 2010). Além disso, não é possível reaproveitar a enzima, sendo sempre necessário uma nova batelada de biocatalisador para outro ciclo reacional (Ashkan *et al.*, 2021). Comparadas às células *in natura*, as células imobilizadas oferecem diversas vantagens metabólicas e operacionais, incluindo o aumento do rendimento e produtividade devido à alta densidade celular, possibilidade de reutilização, maior resistência a inibidores, menor custo e maior estabilidade (Jain; Awasthi; Ghosh, 2023). A estabilidade do biocatalisador é melhorada após a imobilização devido ao impacto de proteção da matriz (Lapponi *et al.*, 2022), garantindo assim que as células imobilizadas sejam mais tolerantes a temperaturas, altas concentrações de substratos, alterações de solvente ou pH do meio reacional (Gao *et al.*, 2021).

O avanço das pesquisas sobre imobilização tem mostrado que a imobilização de células pode ser mais vantajosa que a imobilização de enzimas, pois elimina a necessidade de extrair do micro-organismo a enzima para depois fixá-la em um suporte (Canilha; Carvalho; Silva, 2006). Além disso, deixa de ser necessária a etapa de purificação para obtenção da enzima, diminuindo o número de operações unitárias do processo e o tornando rápido e de baixo custo (Castro; Sato, 2014)

A imobilização de células frequentemente fornece ainda o aumento da conversão de substrato em produtos devido a maior densidade de sítios ativos presentes, menor inibição pelos produtos formados e menor tempo reacional. Entretanto, a imobilização pode acarretar em maiores custos de investimentos, impor limitações difusionais aos reagentes e produtos e até mesmo causar desativação do biocatalisador (Krasňan *et al.*, 2016)

Dessa forma, a imobilização de células surge como estratégia para contornar problemas relacionados à instabilidade para aplicação em larga escala de bioprocessos enzimáticos, uma vez que é considerada uma das ferramentas mais eficientes para contornar problemas relacionados à instabilidade e inadequação para uso de biocatalisadores na presença de alguns solventes e/ou condições de pH, temperatura ou a presença de agentes que ocasionam a desnaturação enzimática (Ribeiro *et al.*, 2023). Além disso, técnicas de imobilização celular tem se mostrado eficazes em diversas áreas, como ambiental, farmacêutica e alimentícia,

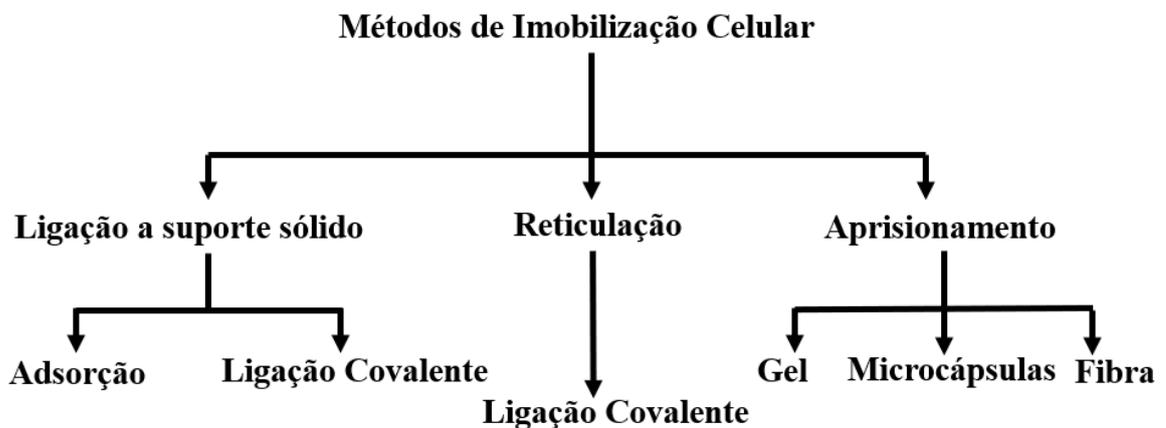
principalmente devido à alta eficiência e baixo custo que proporcionam (Jain; Awasthi; Ghosh, 2023)

3.3.1 Métodos de Imobilização Celular

As células podem ser imobilizadas por diferentes métodos, visto que não existe um método ou suporte de imobilização que seja universalmente adequado para todas as células. Cada célula possui diferentes características físico-químicas, assim como os substratos e produtos, que também possuem propriedades e aplicações únicas. Portanto, as condições ideais de imobilização podem ser determinadas empiricamente, testando diferentes técnicas, a fim de obter maior retenção da atividade enzimática, estabilidade operacional e durabilidade (Souza *et al.*, 2017). Além disso, todos os métodos apresentam vantagens e desvantagens e a escolha deve ser baseada em parâmetros como: atividade do biocatalisador, características de regeneração e inativação, custo do procedimento de imobilização, toxicidade dos reagentes de imobilização, e propriedades hidrodinâmicas e características finais desejadas para as células imobilizadas (Mól *et al.*, 2023).

Atualmente, existem diferentes métodos de imobilização (Figura 3), as quais podem ser classificados em três grupos: ligação a um suporte, aprisionamento em matrizes poliméricas e reticulação entre as próprias células (Sheldon, 2007)

Figura 3 - Métodos de imobilização celular



Fonte: Adaptado de Wendhausen Junior (1998, p. 5).

A reticulação envolve a formação de ligações químicas, em que um polímero ou material celular torna-se uma rede tridimensional densa (Cunha *et al.*, 2019), na qual a própria estrutura celular é usada como suporte (sem a adição de um suporte externo) pela adição de um agente químico, que promove a reticulação celular (Garcia *et al.*, 2021). Nesse mecanismo, ocorre a formação de um aglomerado celular, de forma natural ou induzida artificialmente por meio de agentes químicos que promovam ligações cruzadas entre as células, chamados de agentes de reticulação (Cruz *et al.*, 2012). Cunha *et al.* (2019) destaca que a não limitação de transferência de massa como principal benefício dessa técnica. As novas ligações impostas pela reticulação podem melhorar a estabilidade e transferência de massa, mas também podem causar distorções no sítio catalítico da enzima aderida às células microbianas (Cunha *et al.*, 2019).

As técnicas de imobilização por aprisionamento são geralmente simples e, em geral, são as mais utilizadas na imobilização de células, principalmente porque são mais estáveis para resistir às condições operacionais (Jain; Awasthi; Ghosh, 2023). Nesta metodologia, as células são aprisionadas nos espaços vazios de uma rede polimérica composta por polímero natural ou sintético, sendo a rede resultante porosa e rígida o suficiente para permitir a difusão de substratos e produtos e proteger o microrganismo (Lapponi *et al.*, 2022). A aplicação da imobilização de células em géis de alginato é bastante encontrada na literatura para este método, apesar das limitações de transferência de calor e massa e a baixa resistência física apresentada pelo biocatalisador obtido (Souza *et al.*, 2017). O principal mecanismo de imobilização por aprisionamento em matriz polimérica consiste na mistura de células microbianas e um composto gel polimérico com cargas negativas, onde ocorre uma reação denominada gelificação iônica e tem-se a formação de gel de diferentes porosidades, este é o método de aprisionamento das células microbianas em gel mais utilizado pela sua facilidade, baixa toxicidade e alta capacidade de retenção celular (Gonçalves *et al.*, 2020). Dentre as limitações descritas para o uso da matriz de gel, destaca-se a baixa estabilidade na presença de componentes do meio de cultivo, como íons fosfato e citrato, os quais podem promover rupturas e a dissolução das esferas formadas (Giese, 2015). A microencapsulação é a técnica de imobilização por confinamento que protege um composto ativo chamado núcleo através de uma barreira física, onde utiliza-se filtros de membrana microporosa ou uma superfície de interação com dois líquidos imiscíveis, sendo ideal para sistema onde deseja-se obter alta concentração celular (Rodríguez-Restrepo *et al.*, 2017). Por último, o processo de aprisionamento de células em fibra, apresenta alta área superficial e estrutura porosa das membranas nanofibrosas, o que eleva a capacidade catalisadora das células imobilizadas (Antunes *et al.*, 2020).

A imobilização celular por meio de ligação a um suporte pode ocorrer tanto por adsorção quanto por ligação covalente. A imobilização por ligação covalente baseia-se em promover uma funcionalização do suporte para que este contenha um grupo químico capaz de ligar covalentemente com a célula, formando uma forte ligação, que proporciona grande rigidez na estrutura celular e são mais fortes e estáveis do que as interações físicas, produzindo biocatalisadores de elevada estabilidade. Esse método de imobilização é um dos mais populares devido a produção de biocatalisadores com alta estabilidade, resistindo a condições extremas de temperatura, pH, entre outros (Rodrigues *et al.*, 2021) Possui como maior limitação a potencial toxicidade da célula por agentes químicos utilizados para ativação do suporte, tornando a seleção das condições para imobilização mais difícil que em outros métodos de imobilização (Jain; Awasthi; Ghosh, 2023). A imobilização por ligação covalente é preferida quando é crucial manter a estabilidade estrutural e a atividade enzimática a longo prazo, apesar dos desafios adicionais de toxicidade dos reagentes (Liu *et al.* 2022). Por outro lado, a técnica de adsorção consiste na imobilização promovida por ligações de natureza fraca entre a enzima e o suporte, como interações hidrofóbicas, forças de *van der Waals*, ligações de hidrogênio e ligações iônicas entre as células e os grupos reativos do suporte utilizado (Manikandan *et al.*, 2023). Quando os poros do suporte utilizado possuem tamanho adequado, as células em crescimento penetram no suporte e ocupam os espaços vazios dando origem a um biocatalisador imobilizado. Tem como principais vantagens a simplicidade da técnica, o baixo custo por não necessitar de etapas complexas de ativação do suporte para imobilização (Jain; Awasthi; Ghosh, 2023) e ainda, não altera significativamente a estrutura ou a atividade das células, permitindo que ela mantenha suas propriedades catalíticas (Rodrigues *et al.*, 2019). Dependendo da afinidade das interações, a enzima pode adsorver no suporte rapidamente e de forma reversível, ou seja, a mesma pode desorver espontaneamente para o meio reacional (Rios *et al.*, 2018). Além disso, esta estratégia de imobilização confere poucas mudanças na estrutura tridimensional das células com o processo de imobilização, conservando, muitas vezes, sua atividade catalítica.

3.3.2 Suporte de Imobilização

O máximo desempenho das células imobilizadas está associado a escolha do suporte utilizado, e embora existam diversos materiais para aplicação como suportes, deve-se considerar as características das células e uso final pretendido para o biocatalisador (Faria *et*

al., 2021). Alguns dos principais pontos a serem observados na seleção de um suporte para determinada aplicação são: apresentar maior área superficial específica, permeabilidade, insolubilidade, capacidade de regeneração, morfologia e composição, natureza hidrofílica ou hidrofóbica, resistência ao ataque microbiano, resistência mecânica e química (Pereira, 2021). Além disso, o suporte deve ser estável frente aos parâmetros de processo; apresentar baixa denaturação; funcionalidade química; retenção da atividade enzimática inicial; durabilidade e capacidade de reutilização; compatibilidade com as células e substrato; baixo custo e facilidade de manuseio (Zahirinejad *et al.*, 2021). Ademais, a afinidade entre as células e o suporte é essencial para que a imobilização seja eficaz, pois uma baixa afinidade permite a dispersão das células no meio reacional, enquanto uma afinidade muito alta é prejudicial a conversão do substrato (Laskin, 1985).

De acordo com sua origem, os suportes podem ser classificados como materiais orgânicos e inorgânicos. Os materiais orgânicos compreendem a uma classe de suportes muito importantes no campo da imobilização de biocatalisadores, pois apresentam como vantagens o baixo custo, fácil manuseio, boa reprodutibilidade e variedade de grupos funcionais reativos que podem ser introduzidos na sua superfície, entretanto apresentam como maior desvantagem a redução de sua estabilidade mecânica com o tempo de uso (Aguiar-Oliveira; Maugeri, 2010). Por outro lado, os materiais inorgânicos exibem variedades de formas físicas e estruturas químicas que podem ser combinadas para formar um suporte ideal, e permitem maior variação de parâmetros de processo em virtude de sua maior resistência, química, física, térmica e microbiológica, mas tem como ponto negativo os custos elevados (Bezerra, 2012; Mendes *et al.*, 2011).

Os suportes podem ainda, ser classificados quanto à sua morfologia, como porosos e não porosos (Mateo *et al.*, 2007). Os materiais porosos apresentam como principal vantagem uma elevada área superficial interna disponível para a imobilização de células (Dalla-Vecchia; Nascimento; Soldi, 2004). É crucial considerar o diâmetro dos poros, pois estes devem ser suficientemente grandes para acomodar as células, permitir o acesso do substrato e facilitar a dessorção do produto (Dalla-Vecchia; Nascimento; Soldi, 2004). Em suportes não porosos, as células acomodam-se apenas na sua superfície externa, o que facilita a interação do substrato com o catalisador, eliminando a resistência de massa interna (Mendes *et al.*, 2011). Contudo, a pequena área superficial pode ser uma desvantagem (Mateo *et al.*, 2007). Este problema pode ser parcialmente superado pela utilização de partículas finas ou fibras, porém, outras

dificuldades surgem quando se utilizam partículas muito finas, como por exemplo, alta queda de pressão e baixas vazões para operação em reatores contínuos (Mendes *et al.*, 2011).

Assim como não existe um método de imobilização aplicável para todas as células, esse princípio é também utilizado na definição do suporte, pois cada um deles possui vantagens e limitações, sendo necessária uma análise de um conjunto de informações para obter resultados expressivos no processo de imobilização (Zahirinejad *et al.*, 2021).

Em busca por materiais eficientes e de baixo custo para a imobilização de células, vários materiais lignocelulósicos já foram estudados, mas a estrutura e as propriedades físicas da maioria desses materiais não são adequadas para a aplicação em reatores estáveis de leito fixo, principalmente, por resultarem em biocatalisadores com baixas concentrações de células imobilizadas (Roble; Ogbonna; Tanaka, 2003). Entretanto, entre os diferentes suportes descritos na literatura, a esponja vegetal tem se mostrado promissora nos processos de imobilização de células íntegras (Dzionic *et al.*, 2018; Martinez *et al.*, 2016; Mussato *et al.*, 2012; Saeed; Iqbal, 2013) pois além de ser encontrada em abundância no Brasil e se apresentar como um material de baixo custo, destaca-se pela elevada porosidade (79 – 93%), baixa densidade (0,02 – 0,04 g/cm³) e alto volume específico de poros (21– 29 cm³ g⁻¹), características estruturais únicas que podem reduzir a dificuldade na passagem de ar e nutrientes entre as células e o sistema (Saeed; Iqbal, 2013).

A esponja vegetal é derivada do fruto maduro e seco de *Luffa aegyptiaca*, cultivada na maioria das regiões subtropicais e tropicais, tem uma superfície hidrofílica na qual estão localizados muitos grupos funcionais e apresenta uma rede macroporosa que reduz limitações difusionais, proporcionando assim fácil difusão do substrato (Annunciado; Sydenstricker; Amico, 2005). Além disso, é isenta de materiais que possam ser tóxicos para células microbianas, tem operação e aplicação simples, alta estabilidade durante um longo período de uso e são biodegradáveis (Dzionic *et al.*, 2018; Guo *et al.*, 2019).

Muitas informações encontradas na literatura mostraram o potencial de uso da esponja vegetal como material de suporte para aplicações biotecnológicas. Saeed e Iqbal (2013) estudaram a imobilização de células de diversos tipos, incluindo filamentosas e microalgas, fungos, bactérias, leveduras, plantas superiores e hepatócitos humanos e de ratos e concluíram que as células imobilizadas em esponja vegetal tiveram um desempenho melhor do que as células *in natura* e aquelas imobilizadas em materiais poliméricos naturais e sintéticos. Os autores Saeed e Iqbal (2013) ainda mencionam que os estudos mostraram que a esponja vegetal é um material adequado para imobilização celular, pois tem sido usada para imobilizar células

pertencentes a várias classes de organismos em um estado bioativo. Martinez *et al.* (2016) realizaram a imobilização de *Agrobacterium* em esponja vegetal para produzir *curdlan* ao longo de cinco ciclos consecutivos e obtiveram produção média de *curdlan* pelas células imobilizadas de $17,84 \text{ g L}^{-1}$, durante o processo observaram que um grande número de células de *Agrobacterium* aderiram na esponja vegetal, sem nenhuma alteração em sua estrutura, e que apresentaram alta estabilidade após trezentos dias de armazenamento a -18°C . Por fim, a aplicação do *curdlan* obtido por . Martinez *et al.* (2016) em um iogurte funcional resultou em um produto com menor sinerese. Estudos realizados por Mussatto *et al.* (2012) para imobilização de células usando diferentes tipos de materiais de suporte, obteve maior produção de FOS utilizando esponja vegetal ($133,1 \text{ g/L}$) como suporte em relação aos suportes fibra sintética ($120,3 \text{ g/L}$), esponja de aço inoxidável ($130,1 \text{ g/L}$) e cortiça de carvalho ($111,8 \text{ g/L}$). Dzionek *et. al* (2018) imobilizaram todas as células da cepa *Planococcus* S5 em esponja vegetal, para utilizar na degradação de naproxeno tóxico, e identificaram que o biocatalisador desenvolvido a partir da esponja vegetal apresentou alta resistência e degradou concentrações mais elevadas do fármaco em comparação com as células *in natura*.

3.3.3 Células biocatalíticas imobilizadas

Huang *et al.* (2016) realizaram a imobilização de células de *Aspergillus aculeatus* M105, por encapsulamento em alginato de cálcio, onde o pH e a temperatura ideais foram pH 5,0-6,0 e 65°C , obtendo um biocatalisador capaz de ser aplicado na produção de FOS por até 15 ciclos reacionais consecutivos, demonstrando sua capacidade de catalisar a produção de FOS de forma contínua eficiente e estável, sem significativa perda de atividade enzimática. Isso é crucial para aplicações na indústria de prebióticos onde a reutilização do biocatalisador por vários ciclos é desejável para reduzir custos e aumentar a eficiência dos processos biotecnológicos.

Li *et al.* (2019) avaliaram a imobilização de *Alcaligenes sp.* em espuma de poliuretano para tratamento de águas residuais contendo cianeto, obtendo alta estabilização da imobilização com mais altas atividades em faixas de temperatura mais altas e em concentrações mais altas de cianeto em relação às células *in natura*, e ainda, as imobilizadas removeram completamente 500 mg de CN^-/L em 8 horas a 30°C , pH 8,0 e 120 rpm, enquanto 12 horas foram necessárias para o sistema de células *in natura*. Por fim, um biorreator CSTR foi projetado com sucesso e operado de forma constante com aproximadamente 85% da eficiência média total de remoção

por 52 dias. Xu *et al.*, (2020) imobilizaram células de *Penicillium polonicum* para remover chumbo, também no tratamento de águas residuais, alcançando eficiência de 90,3% no tratamento.

Shahri, Vahabzadeh e Mogharei (2020) imobilizaram *Rhizopus oryzae* em esponja vegetal para produção de ácido láctico. Em seu trabalho, determinaram a capacidade de *Rhizopus oryzae* de sintetizar ácido láctico a partir de 10 gL⁻¹ de amido de batata solúvel, e obtiveram um desempenho mais favorável para as células imobilizadas em suporte em comparação com as células *in natura*, onde a produção máxima foi de 5 g/l, obtida em 48 horas.

Gonçalves *et al.* (2020) imobilizou células de *Aspergillus oryzae* IPT-301, contendo enzima FTase previamente reticulada com glutaraldeído, por meio de aprisionamento em esferas de alginato de cálcio, onde as maiores atividades de transfrutoseilação foram obtidas sob condições de reação de 50 °C, pH 5,5 e concentração de substrato 400 g L⁻¹ e os níveis de atividade de transfrutoseilação encontrados com as células reticuladas com glutaraldeído e aprisionadas em alginato de cálcio foram aproximadamente 70% maiores que os obtidos com células *in natura*, não reticuladas com glutaraldeído. Além disso, as células imobilizadas (reticuladas + aprisionadas) retiveram a atividade de transfrutoseilação até o terceiro ciclo de depleção total de sacarose no meio reacional, atestando o uso potencial das esferas na produção contínua de FOS.

Garcia *et al.* (2021) apresentaram resultados promissores ao reticular com glutaraldeído a biomassa catalítica do *Aspergillus oryzae* IPT-301, para a produção de FOS. As células reticuladas mostraram melhor atividade superior a enzima *in natura* em várias temperaturas, pH e concentração de substrato. Os dados cinéticos sugeriram que as células reticuladas apresentam maior afinidade substrato - enzima e taxa de transfrutoseilação do que as células *in natura*. Além disso, após 12 ciclos de reação em batelada, a FTase presente na célula imobilizada manteve 88,9% da atividade inicial, demonstrando maior estabilidade operacional do que a FTase presente na célula *in natura*, que por sua vez, apresentou apenas 50,3% da atividade inicial após o mesmo número de ciclos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

Para a imobilização das células biocatalíticas, foram utilizadas esponjas vegetais adquiridas em comércio local (Poços de Caldas, MG) e sacarose comercial (marca União®), também adquirida em comércio local, para uso como fonte de carbono para os ensaios de cultivo microbiano e como substrato, constituinte do meio reacional.

Além disso, foram utilizados os seguintes reagentes de grau analítico: tris(hidroximetil)aminometano P.A ((HOCH₂)₃CNH₂) (LabSynth®, Brasil) e ácido acético (CH₃COOH) (Dinâmica®, Brasil) para preparação de solução tampão tris-acetato; tartarato de sódio e potássio tetrahidratado (KNaC₄H₄O₆.4H₂O) (Dinâmica®, Brasil), hidróxido de sódio (NaOH) (Dinâmica®, Brasil) e ácido 3,5-dinitrosalicílico (C₇H₄N₂O₇) (Synth®, Brasil) para preparação do reagente DNS; extrato de levedura (LabSynth®, Brasil), nitrato de sódio (NaNO₃) (Dinâmica®, Brasil); Fosfato monopotássico (KH₂PO₄) (LabSynth®, Brasil); Sulfato de magnésio heptahidratado (MgSO₄.7H₂O) (Dinâmica®, Brasil), Cloreto de manganês tetrahidratado (MnC₁₂.4H₂O) (LabSynth®, Brasil) e Sulfato de ferro heptahidratado (FeSO₄.7H₂O) (LabSynth®, Brasil) para a formulação do meio de cultura sintético; Ágar batata dextrose (KASVI®, Brasil); Glicerina (Isofar®, Brasil); Extrato de levedura (Synth®, Brasil), Glicose (Dinâmica®, Brasil), Tween-80 (Dinâmica®, Brasil) e Cloreto de Sódio NaCl (Dinâmica®, Brasil) para produção e armazenamento dos esporos.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Síntese do biocatalisador heterogêneo

4.2.1.1 Microrganismo, condições de cultivo e preparo do inóculo

Para a produção de células biocatalíticas, foi utilizada a cepa do fungo *Aspergillus oryzae* IPT-301, fornecida pelo Laboratório de Biotecnologia Industrial do Instituto de Pesquisas Tecnológicas de São Paulo (LBI/IPT-SP). Os esporos do microrganismo liofilizados foram ressuspensos em 10 mL de água destilada estéril e alíquotas de 70 µL foram inoculadas em meio de cultura sólido, preparado em placa de Petri, contendo (em %, m v⁻¹): ágar batata

dextrose (KASVI®, Brasil) 2,0; glicerina (Isofar®, Brasil) 2,5; extrato de levedura (Synth®, Brasil) 0,5 e glicose (Dinâmica®, Brasil) 2,5. Após incubação por 7 dias a 30 °C em incubadora refrigerada do tipo B.O.D. (Tecnal®, modelo TE-371, Brasil), os esporos produzidos foram coletados, por meio de raspagem utilizando *alça de Drigalski*, em 10 mL de solução constituída por NaCl (Dinâmica®, Brasil) 0,95% (m v⁻¹) e Tween-80 (Dinâmica®, Brasil) 0,1% (v v⁻¹). A suspensão obtida foi homogeneizada com solução de glicerina (Isolar®, Brasil) 20,0% (m v⁻¹), e a concentração de esporos, com auxílio de uma câmara de Neubauer (Newoptics®, Coréia do Sul), foi ajustada para 1 x 10⁷ esporos mL⁻¹, seguido de armazenamento sob refrigeração a - 6 °C (Cunha *et al.*, 2019; Dias *et al.*, 2022; Garcia *et al.*, 2021; Gonçalves *et al.*, 2020; Ribeiro *et al.*, 2023).

4.2.1.2 Preparo do material de suporte

As esponjas vegetais, utilizadas como material de suporte para a imobilização das células microbianas, foram manualmente cortadas para formar peças cúbicas com 1,0 cm de aresta (Figura 4). Durante o preparo do material, o interior das esponjas foi retirado e descartado, utilizando-se apenas as paredes externas das esponjas.

Figura 4 - Esponja vegetal em formato de cubos de 1,0 cm de aresta para a imobilização de células biocatalíticas de *A. oryzae* IPT-301



Fonte: Autor (2024).

Posteriormente, as peças cúbicas de esponja vegetal foram alocadas em um béquer contendo água destilada, de modo que todo material estivesse submerso. O béquer foi

transferido para um banho- maria (Tecnal®, modelo TE-054-MAG, Brasil) a 100 °C por 30 minutos e o material foi lavado e deixado por 24 horas em água destilada, substituída em intervalos de 8 horas. Finalmente, as peças cúbicas foram secas em estufa com circulação e renovação de ar (Tecnal®, Modelo TE-394/2 MP, Brasil) a 70 °C por 24 horas (Iqbal *et al.*, 2005). A Figura 5 ilustra de forma esquemática as etapas para o preparo do material de suporte.

Figura 5 – Pré-tratamento da esponja vegetal para uso como material de suporte



Fonte: Autor (2024).

4.2.1.3 Ensaios de caracterização do material de suporte (esponja vegetal)

A estrutura morfológica e as propriedades texturais da esponja vegetal, na ausência e presença das células biocatalíticas imobilizadas, foram observadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) por meio de um microscópio eletrônico (Zeis EVO MA-10, Alemanha), com tensão de aceleração de 15 kV e distância de 12 mm. As imagens foram ampliadas em 120 vezes. As amostras do material de suporte foram depositadas sobre uma fita de carbono em um porta amostras (*stub*) e foram recobertas por uma fina película de liga de ouro-paládio por meio do processo de *sputtering*, com o uso de um mini *Sputter Coater* (POLARON EMITECH®, modelo SC7620, Inglaterra). O processo de recobrimento teve duração de 3 minutos.

As amostras da esponja vegetal foram previamente preparadas em *Vap Prep* 61 (Sample Degas System), secas a vácuo por 2 h a 60 °C e suas áreas de superfície específica foram determinadas por fisissorção de Nitrogênio a 77 K em analisador Micromeritics Gemini VII Surface Area and Porosity (Micromeritics®, EUA), usando o método BET (Brunauer; Emmett; Teller, 1938). Para a obtenção do volume e tamanho de poros do material de suporte, foi utilizado o método BJH (Barrett; Joyner; Halenda, 1951).

Quanto aos ensaios de análise térmica, o material de suporte foi caracterizado por Termogravimetria (TG) e por Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC). As amostras foram

analisadas em Calorímetro de Varredura Diferencial (TA Instruments®, EUA) a uma taxa de aquecimento e resfriamento de $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ sob vazão de argônio a 100 mL min^{-1} , sendo aquecidas até $300\text{ }^{\circ}\text{C}$. O teor de umidade presente na esponja vegetal foi obtido por secagem direta em estufa com circulação e renovação de ar (Tecnal®, Modelo TE-394/2-MP, Brasil) a $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 horas conforme método adaptado de Zenebon, Pascuet e Tiglea (2008).

A massa por unidade de área da esponja foi determinada utilizando-se a norma ISO 9073-1:1989 - *Textiles - Test methods for nonwovens - Part 1: Determination of mass per unit*. Para isso, utilizou-se três corpos de prova com área de 50.000 mm^2 . A avaliação mecânica das peças foi feita a partir de ensaio de resistência mecânica sob tração, de acordo com a norma ISO 9073-3:1989 - *Textiles - Test methods for nonwovens - Part 3: Determination of tensile strength and elongation*, utilizando-se cinco corpos de prova nas dimensões de $(50 \times 300)\text{ mm}$ por direção do material e foram ensaiados longitudinalmente, mediante utilização de um dinamômetro (Instron®, modelo 5585 H tipo CRE, EUA). A distância inicial entre as garras foi de 200 mm e a velocidade de separação da garra móvel (taxa constante de extensão) foi de 100 mm min^{-1} . Os ensaios foram realizados pelo Laboratório de Química e Manufaturados do Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo (IPT/SP). O material foi condicionado a $(20 \pm 2)\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $(65 \pm 4)\%$ U.R. (umidade relativa) durante 24 horas.

4.2.2 Produção e imobilização das células biocatalíticas

As células biocatalíticas de *A. oryzae* IPT-301, contendo a enzima FTase micelial, foram produzidas por cultivo submerso em meio de cultura sintético. Um volume de 50 mL do meio de cultura, constituído por (em %, m v^{-1}) sacarose 15, extrato de levedura 0,5, NaNO_3 0,5, KH_2PO_4 0,2, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,05, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,03 e $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,001, foi adicionado em frascos Erlenmeyers de 250 mL , vedados com algodão e esterilizados em autoclave vertical (Phoenix Lufarco®, Brasil) por 20 minutos a $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $2,022\text{ atm}$. O pH do meio foi ajustado para 5,5 antes da esterilização. As partículas cúbicas do material de suporte (esponja vegetal), previamente tratados, também foram esterilizadas em autoclave, sob as mesmas condições experimentais, em frascos separados. Posteriormente, 12 peças do material de suporte foram adicionadas ao meio estéril e incubado em agitador orbital do tipo *shaker* (Tecnal®, modelo TE-4200, Brasil), inoculando-se $500\text{ }\mu\text{L}$ de suspensão de esporos do fungo na concentração de 1×10^7 esporos mL^{-1} .

O cultivo foi conduzido a 30 °C e 200 rpm ao decorrer de 50 horas de processo, com coleta de amostras em intervalos de tempo pré-definidos (Ribeiro *et al.*, 2023; Dias *et al.*, 2022; Garcia *et al.*, 2021 e Cunha *et al.* 2019, Ottoni *et al.*, 2012). O conteúdo total do frasco foi filtrado à vácuo e o material retido (células biocatalítica imobilizadas) foi lavado abundantemente com água destilada, armazenado sob refrigeração a 4 °C e, posteriormente, usado para a construção das curvas de crescimento microbiano e ensaios das propriedades bioquímicas do biocatalisador heterogêneo obtido. A Figura 6 ilustra a metodologia utilizada para esta etapa do trabalho. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Figura 6 – Sequência utilizada para produção e imobilização das células



Fonte: Autor (2024).

4.2.3 Construção das curvas de crescimento microbiano

A quantidade de células biocatalíticas imobilizada nas partículas cúbicas de esponja vegetal em função do tempo de cultivo foi obtida mediante a determinação de sua massa seca, conforme método adaptado de Mussatto *et al.* (2009). Para isso, a quantidade de células produzidas foi calculada pela diferença entre as massas de células secas e de suporte contido no meio de cultura ($g_{célula} / g_{suporte}$). A massa celular foi obtida após os ensaios de atividade enzimática por meio da secagem, das células imobilizadas, em estufa com circulação e renovação de ar (Tecnal®, modelo TE-394/2-MP, Brasil) a 40 °C por 48 h. A média da razão dos valores das massas de células secas e do material de suporte, com seus respectivos desvios padrão, foram plotados em função do tempo de cultivo para a construção das curvas de crescimento microbiano. Concomitantemente, também foram monitorados o pH do meio de cultura ao decorrer dos ensaios de cultivo e imobilização das células, cujos valores foram medidos com auxílio de um pHmetro digital (Tecnal®, modelo R-TEC-7/2-MP, Brasil) e plotados em função do tempo de cultivo (Cunha *et al.*, 2019; Perna *et al.*, 2018).

4.3 CARACTERIZAÇÃO DAS PROPRIEDADES BIOQUÍMICAS DO BIOCATALISADOR HETEROGÊNEO

4.3.1 Influência da temperatura e pH do meio reacional na atividade enzimática

Ensaio de planejamento experimental do tipo Delineamento Composto Central Rotacional 2² foram aplicados visando avaliar a influência das variáveis (fatores) pH e da temperatura do meio reacional na atividade de transfrutossilacção do biocatalisador heterogêneo. Para os estudos de planejamento, foram selecionadas temperaturas de 40 e 60 °C e valores de pH de 4,5 e 6,5 como níveis principais. Os valores dos fatores foram selecionados de acordo com Cunha *et al.* (2019) e Faria *et al.* (2021). Desta forma, elaborou-se uma matriz de experimentos (Tabela 1), composta por 11 ensaios com triplicata no ponto central e inserção de pontos axiais. As análises estatísticas foram realizadas pela Análise de Variância (ANOVA) mediante auxílio do *software* PROTIMIZA EXPERIMENTAL DESIGN®.

Tabela 1 – Matriz de Planejamento Experimental

Ensaio	Valores Codificados		Valores Reais	
	pH	Temperatura	pH	Temperatura (°C)
1	-1	-1	4,5	40
2	+1	-1	6,5	40
3	-1	+1	4,5	60
4	+1	+1	6,5	60
5	-1,41	0	4,09	50
6	+1,41	0	6,91	50
7	0	-1,41	5,5	35,9
8	0	+1,41	5,5	64,1
9	0	0	5,5	50
10	0	0	5,5	50
11	0	0	5,5	50

Fonte: Autor (2024).

O modelo para a superfície de resposta foi ajustado a uma variável resposta, Y, ou seja, a atividade de transfrutossilacção. A função resposta, de segunda ordem, para os dois fatores

avaliados foram descritas pela Equação (1) e as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas para p-valores $\leq 0,05$.

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{11} (X_1)^2 + \beta_{22} (X_2)^2 \quad (1)$$

em que X_1 e X_2 representam pH e temperatura, respectivamente, enquanto β_0 , β_1 , β_2 , β_{12} , β_{11} e β_{22} representam os coeficientes estimados pelo modelo estatístico.

Os valores otimizados de pH e temperatura do meio reacional foram utilizados para a realização dos ensaios experimentais posteriores.

4.3.2 Influência da concentração de substrato na atividade enzimática

Determinou-se o perfil de atividade enzimática das células biocatalíticas, *in natura* e imobilizadas, para diferentes concentrações de sacarose comercial (300, 350, 400, 450, 483, 550, 600 e 650 g L⁻¹). O meio reacional foi constituído por 3,8 mL de solução do substrato e 1,2 mL de tampão tris acetato 0,2 mol L⁻¹, pH 5,75 a 50 °C. Ao meio reacional foi adicionado 0,5 g de células *in natura* e, no caso das células imobilizadas, foi adicionado 0,007 g ao meio reacional equivalente a uma peça do biocatalisador heterogêneo. As atividades enzimáticas foram obtidas conforme condições experimentais estabelecidas (tópico 4.4.1). Os ensaios foram conduzidos em triplicata e determinou-se a atividade de transfrutossilação.

4.3.3 Ensaio de estabilidade térmica e obtenção dos parâmetros termodinâmicos

As células biocatalítica, *in natura* e imobilizada, foram incubadas em tampão tris-acetato 0,2 mol L⁻¹, pH 5,75, na ausência de substrato, para uma faixa de temperaturas de 30 °C, 40 °C, 50 °C e 60 °C em intervalos de tempos distintos (1h, 2h, 4h, 8h, 16h e 36h), em banho-maria termostatizado (Tecnal®, modelo TE-054-MAG, Brasil). Posteriormente, as amostras foram submetidas a ensaios de atividade enzimática sob condições padrão. Os experimentos foram conduzidos em triplicata.

A constante de desnaturação térmica de primeira ordem (k_D , em min⁻¹) foi estimada por meio do ajuste do modelo de desativação térmica, proposto por Sadana e Henley (1987), aos dados experimentais, conforme Equação (2) (Araújo *et al.*, 2022; Perna *et al.*, 2017; Silva *et al.*, 2021).

$$\frac{A_T}{A_{T0}} = (1 - \alpha) e^{-(k_d t)} + \alpha \quad (2)$$

em que A_T/A_{T0} é a atividade enzimática residual adimensional, t é o tempo de incubação (min) do biocatalisador heterogêneo e o parâmetro α representa a razão entre as atividades de transfrutossilacção nos estados final (A_T) e inicial (A_{T0}).

A energia de ativação (E_D , em kJ mol^{-1}) para a desnaturação térmica das células biocatalíticas, *in natura* e imobilizada, foi determinada pela linearização da Equação de Arrhenius (Equação 3), em que A_d representa o fator de frequência de colisões de Arrhenius, R é a constante universal dos gases ($8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$) e T é a temperatura absoluta (K).

$$k_d = A_d e^{-\frac{E_D}{RT}} \quad (3)$$

O tempo de meia-vida ($t_{1/2}$, em min), que é o tempo necessário para reduzir a atividade enzimática pela metade do seu valor inicial (Jay; Loessner; Golden, 2005), o fator de estabilidade (FE) e as variações de entalpia (ΔH_D , em kJ mol^{-1}), energia de Gibbs (ΔG_D , em kJ mol^{-1}) e entropia (ΔS_D , em $\text{kJ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$) de ativação para a desnaturação térmica foram calculadas pelas Equação (4), (5), (6), (7) e (8), respectivamente, em que h representa a constante de Planck ($11,04 \times 10^{-36} \text{ J min}^{-1}$) e k_B é a constante de Boltzmann ($1,36 \times 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$) (Faria *et al.*, 2021; Saqib *et al.*, 2010; Souza *et al.*, 2015).

$$t_{1/2} = \frac{\ln(2)}{k_d} \quad (4)$$

$$FE = \frac{t_{1/2} \text{ células imobilizadas}}{t_{1/2} \text{ células in natura}} \quad (5)$$

$$\Delta H_D = E_D - RT \quad (6)$$

$$\Delta G_D = -RT \ln \left(\frac{k_D h}{k_B T} \right) \quad (7)$$

$$\Delta S_D = \frac{\Delta H_D - \Delta G_D}{T} \quad (8)$$

4.3.4 Ensaios de estabilidade do biocatalisador frente ao pH de incubação

As células biocatalíticas, *in natura* e imobilizada em esponja vegetal, foram incubadas, na ausência de substrato, em tampão tris-acetato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ em diferentes pH (3,0; 4,0; 5,0; 5,75; 6,0 e 7,0), durante 24 horas a $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Ao término da incubação, as atividades de transfrutoseilação foram determinadas sob condições experimentais estabelecidas. Os experimentos foram realizados em triplicata.

4.3.5 Ensaio de estabilidade operacional em modo batelada

As células biocatalíticas imobilizadas (0,15 g de células imobilizadas em 3 cubos de esponja vegetal) foram adicionadas em meio reacional contendo 3,7 mL de solução de sacarose comercial 400 g L^{-1} e 1,2 mL de tampão tris-acetato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, pH 5,75. A reação enzimática foi conduzida sob condições padrão. Ao término de cada ciclo batelada, correspondente a 1 h de reação, o biocatalisador heterogêneo foi removido do meio reacional por filtração à vácuo, lavado abundantemente com água destilada e, então, reintroduzido em um novo e similar meio reacional. Este processo foi realizado durante 12 ciclos consecutivos em modo batelada. As atividades de transfrutoseilação do biocatalisador heterogêneo foram avaliadas considerando o número de ciclos reacionais. Também foram obtidos os parâmetros de desempenho conversão, rendimento e produtividade (Fogler, 2012; Levenspiel, 1999). Os experimentos foram conduzidos em triplicata.

4.3.6 Ensaio de estabilidade de armazenamento

As atividades de transfrutoseilação das células biocatalíticas imobilizadas foram monitoradas ao decorrer de 48 dias de estocagem, na ausência e presença de solução tampão tris-acetato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ pH 5,75. O biocatalisador heterogêneo foi mantido sob refrigeração a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ e a atividade enzimática foi obtida sob condições padrão. Os experimentos foram conduzidos em triplicata.

4.3.7 Avaliação da eficiência das células biocatalíticas imobilizadas em sistema reacional contínuo

A avaliação da eficiência das células biocatalíticas imobilizadas foi realizada em reator de leito fixo (PBR), confeccionado em vidro de borossilicato com diâmetro e comprimento nominais de 1,0 e 20 cm, respectivamente. O PBR foi recheado com 0,84 g de células imobilizadas em esponjas vegetais, correspondendo a 80% do comprimento do reator. A reação foi conduzida a 50 °C por 180 min, alimentando a solução reagente, constituída por 76 % (v v⁻¹) de sacarose comercial 400 g L⁻¹ e 24 % (v v⁻¹) de tampão tris-acetato 0,2 mol L⁻¹ pH 5,75, com vazão volumétrica de 1 mL min⁻¹ em fluxo ascendente, com o auxílio de uma bomba peristáltica (MS TecnoPON®, modelo LAP-101-3, Brasil). As amostras foram coletadas por um período de 180 minutos de reação, em intervalos de tempo predefinidos. Imediatamente após a coleta, as amostras foram submersas em água em ebulição por 10 min, seguido por resfriamento em banho de água e gelo por 5 min para inativação enzimática. Posteriormente, as atividades foram calculadas pela Equação (9) (Dias *et al.*, 2022; Ribeiro *et al.*, 2023). Por fim, foram obtidos os perfis de atividade de transfrutossilagem do biocatalisador heterogêneo e calculados os parâmetros de desempenho (produtividade, conversão e rendimento) para o sistema reacional contínuo a partir das concentrações de sacarose (substrato) e FOS (produto desejado) (Fogler, 2012; Levenspiel, 1999;).

$$A_T \left(\frac{U}{g} \right) = \frac{F_T Q}{m_{cs}} \quad (9)$$

em que F_T é a concentração molar de frutose transfrutossilada (em $\mu\text{mol L}^{-1}$), Q é a vazão volumétrica de alimentação do substrato (em mL min⁻¹) e m_{cs} é a massa seca de células biocatalíticas imobilizadas em esponja vegetal (em g).

A produtividade enzimática (P_{enz}) foi calculada por meio da Equação (10), considerando-se a razão entre a atividade de transfrutossilagem (A_T) no estado estacionário e o tempo de residência ($\tau_{residência}$) no reator PBR (Zambelli *et al.*, 2016; Dias *et al.*, 2022).

$$P_{enz} = \frac{A_T}{\tau_{residência}} \quad (10)$$

4.4 MÉTODOS ANALÍTICOS

4.4.1 Determinação das atividades enzimáticas em modo batelada

A atividade enzimática de transfrutossilação foi determinada conforme procedimento adaptado de Cunha *et al.* (2019), Fernandez *et al.* (2007) e Ottoni *et al.* (2012). Para isso incubou-se 3 partículas de esponja vegetal contendo células biocatalíticas imobilizadas em 3,7 mL de solução de sacarose 47 % (m v⁻¹) e 1,2 mL de tampão tris-acetato 0,2 mol L⁻¹, pH 5,5. A reação foi conduzida em banho Dubnoff a 50 °C, 190 rpm por 1 h e interrompida pela imersão do meio reacional em água em ebulição por 10 min, seguido por resfriamento em banho de água e gelo por 5 min para inativação enzimática. Posteriormente, o meio reacional foi filtrado à vácuo e quantificou-se a concentração de açúcares redutores (AR) e glicose (G). A atividade de transfrutossilação (A_T) foi calculada pela Equação (11).

$$A_T \left(\frac{U}{g} \right) = \frac{F_T V_r}{t_r m_{cs}} \quad (11)$$

em que F_T é a concentração molar de frutose transfrutossilada (em $\mu\text{mol L}^{-1}$), V_r é o volume do meio reacional (em L), t_r é o tempo de reação (em min) e m_{cs} é a massa seca de células biocatalíticas imobilizadas em esponja vegetal.

Por definição, uma unidade (1U) de atividade de transfrutossilação se refere a quantidade de enzima que transfere um micromol (1 μmol) de frutose por minuto por grama de célula seca, sob condições experimentais estabelecidas (Cunha *et al.*, 2019; Dias *et al.*, 2022; Faria *et al.*, 2021; Garcia *et al.*, 2021; Gonçalves *et al.*, 2020; Ribeiro *et al.*, 2023).

4.4.2 Quantificação dos açúcares

As concentrações de glicose (G) e açúcares redutores (AR) foram quantificadas pelos métodos colorimétricos GOD/PAP® (kit enzimático glicose-oxidase) e DNS (ácido 3,5 dinitrosalicílico), respectivamente. A concentração de frutose transfrutossilada (transferida) (F_T) no meio reacional foi determinada pela Equação (12) (Chen; Liu, 1996; Cunha *et al.*, 2019; Faria *et al.*, 2021; Gonçalves *et al.*, 2020; Silva *et al.*, 2021).

$$[F_T] = 2[G] - [AR] \quad (12)$$

4.4.2.1 Determinação da concentração de açúcares redutores

A concentração dos açúcares redutores (AR), presentes no meio reacional, foi determinada pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), adaptado de (Miller, 1959) conforme descrito por (Vasconcelos; Pinto; Aragão, 2013). A solução DNS (Reagente A) foi preparada pela dissolução de 10,0 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico em 200,0 mL de solução 2 mol L⁻¹ de hidróxido de sódio. Paralelamente, foi preparada 500 mL de uma solução aquosa (Reagente B) constituída por 600 g L⁻¹ de tartarato de sódio e potássio. Após a dissolução, ambos os reagentes (A e B) foram misturados e o volume final da mistura aferido para 1,0 L em balão volumétrico. A quantificação dos ARs foi realizada pela adição, em tubo de ensaio, de 1,0 mL da amostra oriunda da reação enzimática, em 1,0 mL da solução preparada (Reagentes A + B) sob agitação vigorosa. A reação foi conduzida em banho maria (Tecnal®, modelo TE-054-MAG, Brasil) a 100 °C por 10 min e interrompida por resfriamento em banho de água e gelo por 5 min, seguido pela adição de 8,0 mL de água destilada. Posteriormente, alíquotas do meio reacional foram analisadas com auxílio de espectrofotômetro UV-Visível monofeixe (Bel Engineering®, modelo UV-M51) a 540 nm, visando obter as absorvâncias e, conseqüentemente, determinar as concentrações dos açúcares redutores mediante auxílio da curva de calibração obtida por regressão linear, para o método DNS (Figura 22, Apêndice A). A solução foi armazenada em local protegido da luz num frasco âmbar, envolvido com papel alumínio atendendo ao prazo de validade.

O mesmo procedimento analítico foi realizado para a obtenção do branco (amostra controle), porém, substituindo a amostra, oriunda da reação enzimática de transfrutossilacção, por água destilada.

4.4.2.2 Determinação da concentração de glicose

A concentração de glicose presente no meio reacional foi determinada pelo método GOD-PAP que consiste em um kit enzimático contendo glicose oxidase (GOD), peroxidase (POD), 4-aminofenazona (4-AF), tampão fosfato pH 7,0 e 4-hidroxibenzoato. O kit enzimático utilizado foi da marca LaborLab® (Guarulhos, Brasil). A quantificação da glicose no meio reacional foi realizada pela adição, em um tubo de ensaio, de 35 µL de amostra, obtida da reação enzimática, em 3,5 mL de solução reagente (kit enzimático). A reação foi conduzida em banho Dubnoff (marca Bunker®, modelo NI 1232) a 37 °C por 5 min. As absorvâncias foram obtidas com o auxílio de espectrofotômetro UV-Visível monofeixe (Bel Engineering®, modelo UV-M51) a 505 nm e, posteriormente, utilizadas para a obtenção das concentrações de glicose no

meio reacional por meio do “*fator f*” estimado a partir da amostra padrão fornecida pelo fabricante.

O mesmo procedimento analítico foi realizado para a obtenção do branco (amostra controle), porém, substituindo a amostra, oriunda da reação enzimática, por água destilada.

4.4.2.3. Quantificação de sacarose e fruto-oligossacarídeos

As concentrações de sacarose e de FOS (1-kestose, nistose e 1- β -frutofuranosilnistose), para cálculo dos parâmetros de desempenho (conversão, rendimento e produtividade) foram obtidas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizando duas colunas cromatográficas acopladas em série (Shodex SC 1011, 300 x 7,8 mm) acondicionadas a 72 °C. Foi utilizado um sistema HPLC Waters (EUA) constituído por uma bomba isocrática W515, por um detector de índice de refração W2414, por um injetor automático W2707 e por *software* de controle e tratamento de dados Empower 2.0. As amostras foram eluídas com solução de EDTACa(Na)₂ 5×10^{-2} mol L⁻¹ a uma vazão de 0,4 mL min⁻¹ e os componentes foram identificados por comparação de tempos de retenção com padrões analíticos dos mesmos analitos (Fuji Wako Chemicals, Japão).

4.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os ensaios foram realizados em triplicata e o tratamento dos dados experimentais foi submetido ao *teste de Tukey* pela metodologia de análise de variância (ANOVA), a um nível de significância de 5%. O *teste de Tukey* avaliou a diferença significativa entre os dados experimentais, comparando-os um a um.

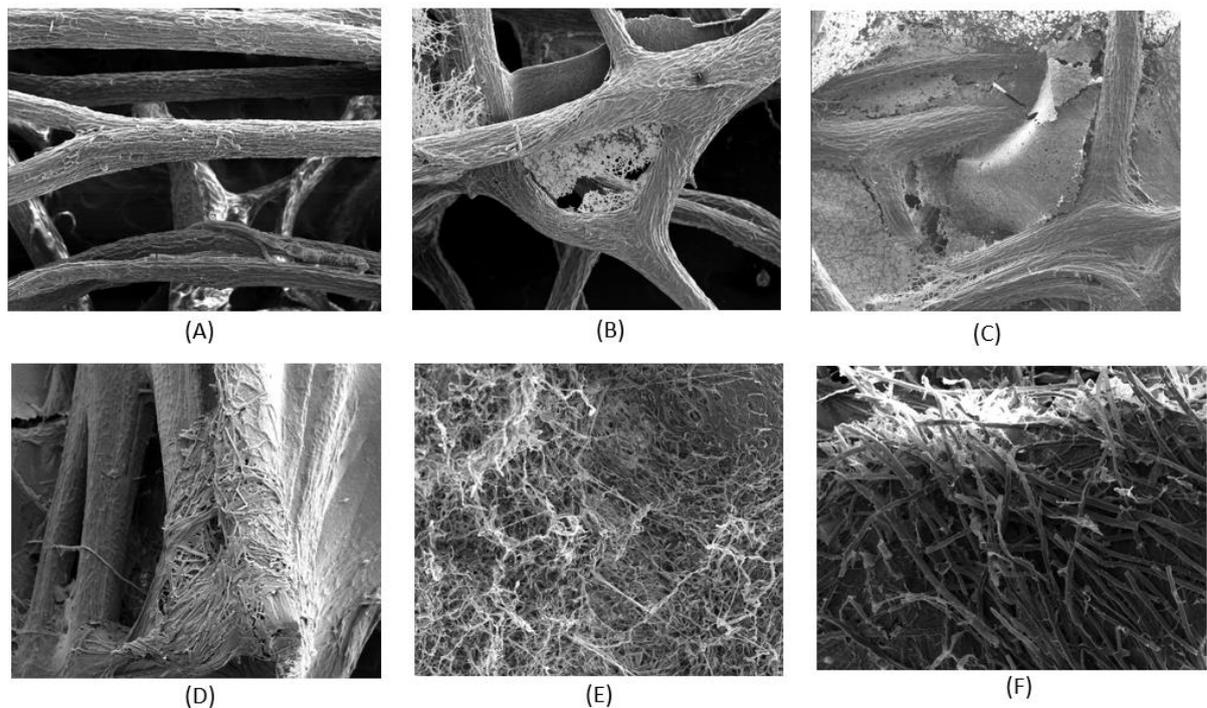
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DO BIOCATALISADOR HETEROGÊNEO

5.1.1 Microscopia eletrônica de varredura

Para avaliar o crescimento das células fúngicas, com atividade biocatalítica, nas esponjas vegetais, imagens foram obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) durante o tempo de cultivo (Figura 7). Na Figura 7(A) foi observado a estrutura íntegra e fibrosa da esponja, antes do cultivo celular, com poros longilíneos interconectados com tamanhos maiores que 1 mm. Nas Figuras 7(B) a 7(F) foi observado a fixação e o crescimento celular nos poros e ao longo das ranhuras e filamentos das esponjas vegetais após 20, 24, 36, 44 e 50h de cultivo celular, respectivamente. As imagens de MEV evidenciaram a evolução do crescimento das células microbianas e, conseqüentemente, o fechamento parcial da porosidade original da esponja, como resultado positivo do cultivo celular submerso.

Figura 7 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura



Fonte: Autor (2024).

Legenda: **A)** esponja vegetal antes do cultivo celular. **B)** esponja vegetal após 20 h de cultivo celular. **C)** esponja vegetal após 24 h de cultivo celular. **D)** esponja vegetal após 36 h de cultivo celular. **E)** esponja vegetal após 44 h de cultivo celular. **F)** esponja vegetal após 50 h de cultivo celular. As imagens foram obtidas por meio de um microscópio eletrônico (Zeis EVO MA-10, Alemanha), com tensão de aceleração de 15 kV e distância focal de 12 mm.

5.1.2 Área superficial específica, porosidade e umidade do material de suporte

A área superficial específica obtida para a esponja vegetal a partir do método de Brunauer, Emmett e Teller (B.E.T.) foi de $1,35 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$, cujo valor obtido para a matriz orgânica foi baixo em relação a outros materiais de suporte, mas coerente com trabalhos reportados na literatura que avaliaram esponjas vegetais sem tratamento prévio. Antunes *et al.* (2016) obtiveram uma área superficial específica de $2,21 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ para a esponja vegetal (*Luffa cylindrica*), ativada com ácido clorídrico e hidróxido de sódio, para estudos de adsorção de corantes. Mashkoo e Nasar (2019) obtiveram uma área superficial específica de $0,74 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ para a esponja vegetal ao caracterizar a esponja vegetal para uso adsorvente na remoção de verde malaquita de solução aquosa. Tang *et al.* (2014), obtiveram para a esponja vegetal uma área específica de $1,24 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ utilizada nos estudos de remoção de Cu(II) de soluções aquosas.

Por meio do método de Barrett, Joyner e Halenda (B.J.H), obteve-se um diâmetro médio de poros de $20,91 \text{ \AA}$ para a esponja vegetal, comprovando que a matriz orgânica apresenta tamanho de poros que possibilita a difusão de gases e o fluxo de substratos, essenciais para o crescimento e imobilização das células microbianas. Song *et al.* (2022), obtiveram para a esponja vegetal um diâmetro médio de poros de $39,1 \text{ \AA}$ em um estudo sobre compósitos de mudança de fase suportados por estrutura de carbono microtubular derivada de esponja vegetal.

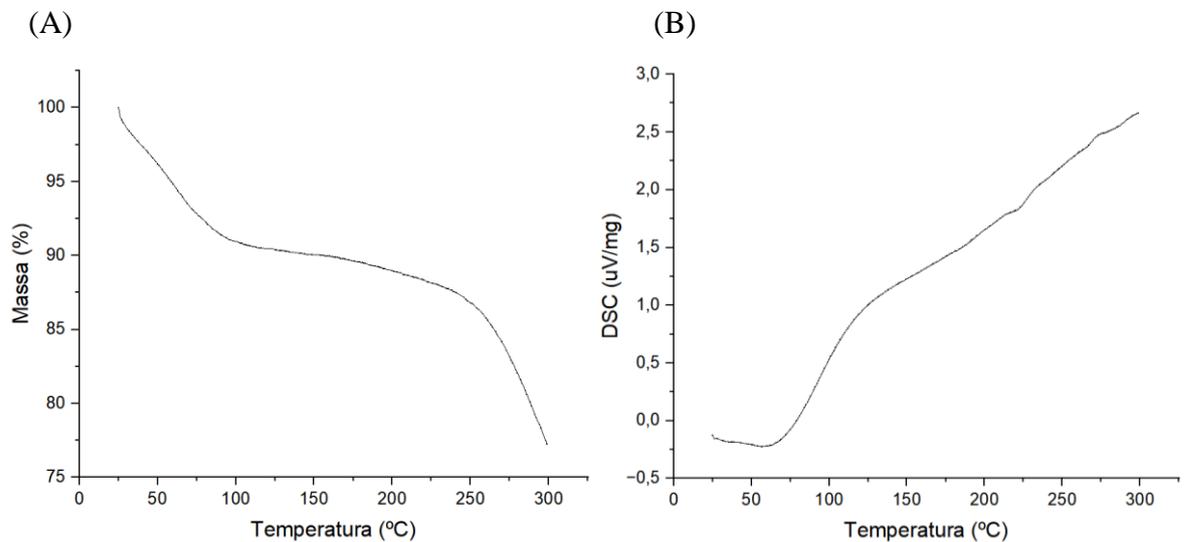
(Castro *et al.*, 2017; Martinez *et al.*, 2015). Também se obteve, em estufa de secagem, a umidade da esponja vegetal, cujo valor médio foi de $9\% \pm 0,25\%$, indicando que o material de suporte apresentou baixo percentual de água retida, o que minimiza os riscos de contaminação biológica e interferência nos estudos de imobilização das células de *A. oryzae* IPT-301. Nyong *et al.* (2021) avaliaram a composição da esponja vegetal e obtiveram em seu estudo umidade $9,30\%$ para ela.

5.1.3 Dados Termogravimétricos

As análises de Termogravimetria (Figura 8A) e Calorimetria Exploratória Diferencial de Varredura (Figura 8B) permitiram obter a temperatura de degradação da esponja vegetal, utilizada como material de suporte orgânico para a imobilização de células microbianas neste trabalho.

A perda de massa, de aproximadamente 10% entre 25 °C e 75 °C, pode ser atribuída à desidratação da esponja vegetal, em que se verificou a perda de massa de água retida, cujo valor obtido corrobora com as análises de umidade realizadas. De 75 °C a 250 °C observou-se que a massa de matéria orgânica se mantém estável, aproximadamente constante. A degradação do material orgânico (esponja vegetal) ocorreu a partir de 250 °C, em que o decaimento da curva e a maior perda de massa foram verificados. De acordo com Tanobe *et al.* (2005), a perda de massa entre 63,6% a 68% está associada à degradação da hemicelulose e da celulose e a quebra de ligação da lignina ocorre ao atingir temperaturas superiores a 400 °C. Os dados de termogravimetria indicaram que a esponja vegetal é bastante termoestável e, portanto, adequado para uso como material de suporte para a imobilização de células.

Figura 8 - Curva TG/DSC da esponja vegetal



Fonte: Autor (2024).

Legenda: A) Análise termogravimétrica e B) Curva DSC

Os resultados do ensaio de DSC foram pouco expressivos, visto que há poucos indícios da decomposição da hemicelulose e da degradação da celulose ou outros fenômenos térmicos ocorrendo. Um dos motivos da lignina ter uma faixa tão ampla de degradação se deve a diferentes estabilidades térmicas dos vários grupos funcionais de oxigênio presentes em sua estrutura, fazendo com que suas cisões ocorram em diferentes temperaturas (Liu *et al.*, 2016).

5.1.4 Determinação da massa por unidade de área

Inicialmente, avaliou-se a massa por unidade de área, obtendo o valor médio de $245,10 \pm 133,07 \text{ g m}^{-2}$. A Tabela 2 indica os resultados obtidos a partir dos ensaios realizados para os corpos de prova.

Tabela 2 - Massa por unidade de área para esponja vegetal

Corpo de prova ^(*)	Massa por unidade de área	
	Valor individual (g/m ²)	Valor Médio (g/m ²)
1	422,67	245,10 ± 133,07
2	198,52	
3	135,68	
4	238,62	
5	230,00	

Fonte: Autor (2024).

Legenda: ^(*) Amostras de esponja vegetal (material de suporte) com comprimento e largura iguais a 180 mm e 5 mm, respectivamente.

5.1.5 Ensaios mecânicos

As Tabelas 3 e 4 indicam, respectivamente, os valores de resistência a tração obtidos individualmente para as amostras ensaiadas, bem como seus respectivos alongamentos e os valores de resistência mecânica a tração e alongamentos médios obtidos.

Tabela 3 - Resistência a tração e alongamento da esponja vegetal para os corpos de prova avaliados

Direção	Corpo de prova ^(*)	Força máxima (N)	Alongamento à força
			máxima (%)
A (maior)	1	234,92	7,08
	2	96,75	6,92
	4	254,11	9,42

(continua)

Tabela 3 - Resistência a tração e alongamento da esponja vegetal para os corpos de prova avaliados

(conclusão)			
Direção	Corpo de prova ^(*)	Força máxima (N)	Alongamento à força máxima (%)
B (menor)	5	239,94	4,75
	1	89,97	20,08
	2	84,72	12,67
	3	41,86	21,92
	4	42,95	23,92
	5	42,85	23,67

Fonte: Autor (2024).

Legenda: (*) Amostras de esponja vegetal (material de suporte) com comprimento e largura iguais a 180 mm e 5 mm, respectivamente.

Tabela 4 - Resistência a tração e alongamento médios da esponja vegetal

Direção	Força máxima (N)	Alongamento à força máxima (%)
A (maior)	185,94 ± 78,47	7,18 ± 1,68
B (menor)	60,47 ± 24,81	20,45 ± 4,62

Fonte: Autor (2024).

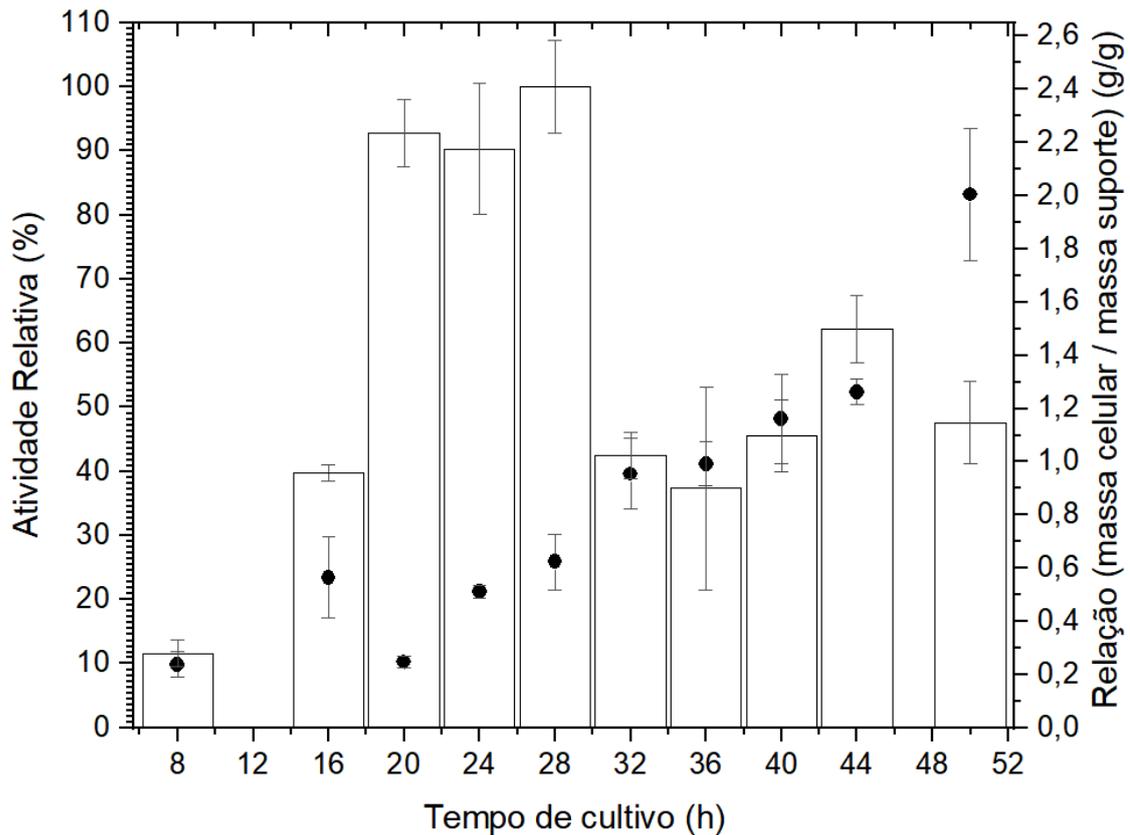
O coeficiente de variação em geral é bastante elevado, tanto para a força máxima quanto para o alongamento. Esse fato está associado à característica irregular do material, bem como sua elevada porosidade (Chen *et al.*, 2018)

5.2 CURVA DE CRESCIMENTO MICROBIANO E MONITORAMENTO DO PH DO MEIO DE CULTURA

A esponja vegetal foi previamente tratada para a imobilização das células fúngicas com atividade enzimática. Os ensaios de cultivo e imobilização foram executados visando determinar o tempo de cultivo e imobilização concomitantes de modo a se obter um biocatalisador heterogêneo com maior valor de atividade de transfrutossilação. Portanto, pela

Figura 9, foi possível observar a relação entre o tempo de cultivo, a atividade enzimática e a massa de células biocatalíticas produzidas e imobilizadas em esponja vegetal.

Figura 9 - Influência do tempo de cultivo microbiano nas atividades de transfrutossilção de células de *A. oryzae* IPT-301 imobilizadas em esponja vegetal



Fonte: Autor (2024).

Nota: Condições de cultivo em meio de cultura sintético: pH 5,5, 30 °C, 200 rpm e 52 h de cultivo. A atividade enzimática máxima ($559,96 \pm 40,37 \text{ U g}_{\text{massa seca}}^{-1}$) foi definida como 100 % da atividade relativa, cujo valor está representado por barras. A relação (massa celular / massa suporte g/g) está representada por pontos.

A fase de latência (ou “*fase lag*”) é caracterizada pela adaptação das células ao novo meio, sendo o período em que antecede o crescimento exponencial das células, cujo crescimento se inicia de maneira lenta sem um grande aumento da massa celular (Ali *et al.*, 2018) Esta fase é influenciada pela idade da cultura, quantidade de células inoculadas, tipo de microrganismo, características do substrato e do meio ambiente (pH, oxigênio, composição do meio, substâncias inibidoras, etc.) e ocorre imediatamente após o processo de inoculação (Tagliani, 2023). Não foi possível identificar, claramente, a *fase lag* nesse cultivo, uma vez que possivelmente ela ocorreu anterior ao tempo de 8h de processo. Cunha *et al.* (2019) e Barbosa

(2022) identificaram a presença da fase de latência para o *A. oryzae* IPT-301, cultivado em meio de cultura sintético e similar a este trabalho, durante as primeiras 8h de cultivo ao se avaliar o crescimento das células do fungo, respectivamente, na ausência e presença de espuma de poliuretano.

Na Figura 9 foi possível identificar a fase de crescimento exponencial (ou “fase log”), caracterizada pelo início da alta proliferação de células, cuja massa e densidade celular aumentam exponencialmente com tempo e todos os componentes da célula crescem na mesma taxa (Tagliani, 2023). Essa fase se estendeu ao longo das 52 h de cultivo, obtendo-se um pico de concentração de células imobilizadas igual a $2,08 \pm 0,26 \text{ g}_{\text{células}} \text{ g}_{\text{suporte}}^{-1}$. Não foram observadas nesse cultivo, para o tempo inferior a 52 h, as fases de declínio ou morte celular.

Mussatto *et al.* (2009) estudaram a produção e imobilização de células de *Aspergillus japonicus* em matrizes cúbicas de esponja de poliuretano para a produção de FOS. Os autores obtiveram uma concentração de células imobilizadas de $0,48 \text{ g}_{\text{células}} \text{ g}_{\text{suporte}}^{-1}$ após 48 h de processo, 28 °C e 160 rpm, em meio de cultura sintético. Também avaliaram a imobilização em fibra vegetal, para as mesmas condições operacionais e obtiveram uma concentração de $1,25 \text{ g}_{\text{células}} \text{ g}_{\text{suporte}}^{-1}$.

Mussatto *et al.* (2012) também reportaram a produção e imobilização de células de *Penicillium expansum* em matrizes de esponja vegetal para a produção de FOS. Os autores obtiveram uma concentração de células imobilizadas de $0,28 \text{ g}_{\text{células}} \text{ g}_{\text{suporte}}^{-1}$ após 48 h de processo, 25 °C e 160 rpm, em meio de cultura sintético. Ressalta-se que, para o mesmo tempo de cultivo e utilizando o fungo *A. oryzae* IPT-301, obteve-se neste trabalho um melhor resultado para a imobilização das células fúngicas, em que se alcançou $0,65 \text{ g}_{\text{células}} \text{ g}_{\text{suporte}}^{-1}$ (Figura 9).

Castro *et al.* (2017) avaliaram a imobilização de células integras de *Aureobasidium pullulans* em materiais sintéticos, subprodutos agroindustriais e materiais minerais, visando a produção de FOS. A concentração obtida de células imobilizadas foi de $2,2 \text{ g}_{\text{células}} \text{ g}_{\text{suporte}}^{-1}$ após 25 h de cultivo celular em meio sintético, a 28 °C e 150 rpm.

Barbosa (2022) em sua pesquisa sobre a imobilização de células *Aspergillus oryzae* IPT-301 em esponja de poliuretano obteve $11,89 \text{ g}_{\text{células}} \text{ g}_{\text{suporte}}^{-1}$ após 32 horas de cultivo, em pH 5,5, 200 rpm e 30 °C.

Na Figura 9 também estão dispostos os valores de atividade enzimática das células microbianas imobilizadas em esponja vegetal em função do tempo de cultivo celular. Para 28 h de processo, alcançou-se uma atividade de transfrutoseilação máxima igual a $559,96 \pm 40,37 \text{ U g}^{-1}$. Os resultados mostraram que, apesar do aumento da massa celular imobilizada com

o avanço do tempo de cultivo, a partir de 32 h houve uma redução expressiva da atividade enzimática. Diante disso, definiu-se 28 h como o tempo de cultivo favorável para a produção e imobilização das células biocatalíticas de *A. oryzae* IPT 301, sendo este período utilizado como tempo de cultivo padrão para as demais etapas deste trabalho. É importante destacar que este foi o menor tempo de cultivo obtido quando comparado aos dados da literatura relacionados aos biocatalisadores para a síntese de FOS. Mussatto *et al.* (2012) obtiveram células de *P. expansum*, com maior valor de atividade enzimática, cultivadas em 48 h, ao passo que Cunha *et al.* (2019) obtivera 64 h de cultivo para se alcançar os maiores valores de atividade de transfrutoseilação para as células de *A. oryzae* IPT 301. Esse fator, torna este trabalho ainda mais atrativo para indústria, que constantemente busca processos rápidos e eficientes para otimizar sua produtividade. A Figura 10 ilustra as células de *A. oryzae* IPT-301 imobilizadas em esponja vegetal após filtração para 28 h de cultivo submerso em meio sintético.

Figura 10 - Células de *A. oryzae* IPT-301 imobilizadas em esponja vegetal



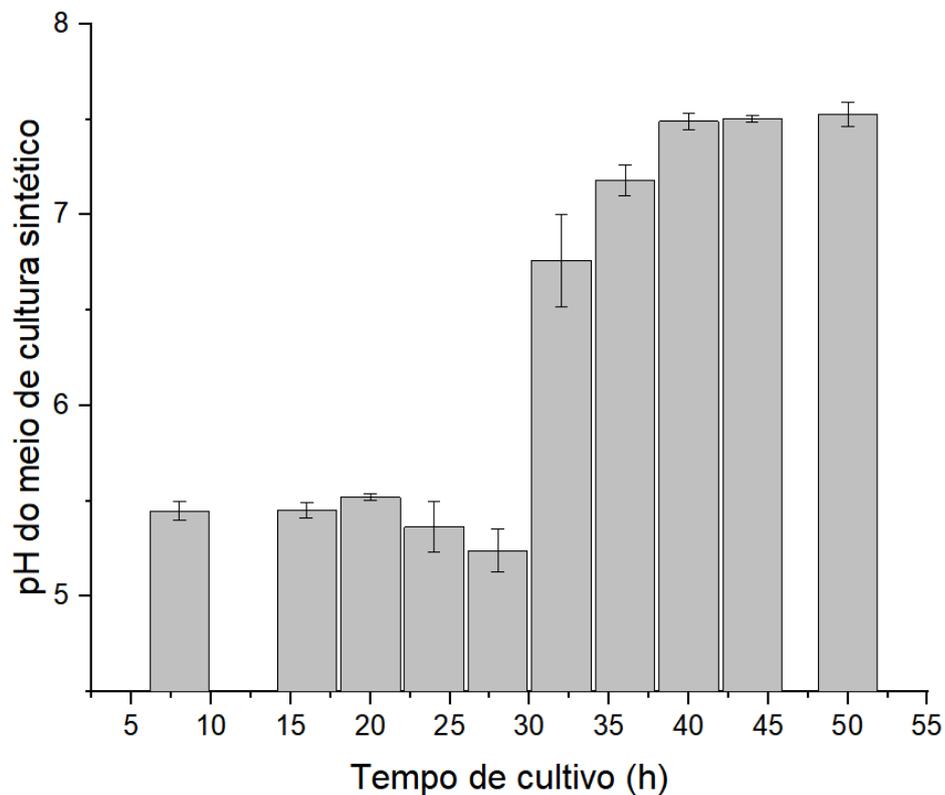
Fonte: Autor (2024).

Nota: Condições experimentais: microrganismo cultivado em meio sintético (pH 5,5), 30 °C, 200 rpm por 28 h.

Durante o cultivo celular, observou-se a variação dos valores de pH do meio ao decorrer do tempo de cultivo (Figura 11). Entre os tempos de 8 h e 28 h, notou-se que o meio de cultura se manteve em pH 5,5. No entanto, a partir de 32 h, teve-se um aumento dos valores de pH do meio de cultura e, conseqüentemente, uma redução da atividade de transfrutoseilação das células microbianas. O aumento do pH pode estar associado à geração e secreção de metabólitos pelo

microrganismo e por produtos formados por meio da própria ação das células, como compostos aminados gerados por proteases, que podem tornar o meio de cultura alcalino (Souza; Ribeiro; Coelho, 2019). Por sua vez, o meio alcalino pode desnaturar as células biocatalíticas de *A. oryzae* IPT-301 acarretando na redução da atividade enzimática, fato este observado na Figura 11. Extremos de pH (ácido ou básico) podem afetar diretamente a ionização dos resíduos de aminoácidos dos sítios ativos da enzima aderida à célula microbiana, afetando a ligação do substrato e a sua transformação em produto (Barbosa, 2022; Garcia *et al.*, Gonçalves *et al.*, 2020).

Figura 11 - Progressão do pH do meio de cultura em função do tempo de cultivo celular



Fonte: Autor (2024).

Nota: Condições experimentais: microrganismo cultivado em meio sintético (pH 5,5), 30 °C, 200 rpm por 50 h

5.3 CARACTERIZAÇÃO DAS PROPRIEDADES BIOQUÍMICAS DAS CÉLULAS MICROBIANAS MOBILIZADAS

Foram realizados estudos de caracterização das propriedades bioquímica das células biocatalíticas de *A. oryzae* IPT-301 imobilizadas em esponja vegetal. Para tal, o cultivo celular

submerso ocorreu em meio de cultura sintético, à temperatura de 30 °C, com velocidade de agitação de 200 rpm ao decorrer de 28 h de processo.

5.3.1 Otimização da temperatura e do pH do meio reacional na atividade enzimática

Com o intuito de se avaliar os efeitos do pH e da temperatura do meio reacional sobre as atividades enzimáticas de células de *A. oryzae* IPT-301 imobilizadas em esponja vegetal, realizou-se um planejamento experimental do tipo delineamento composto central rotacional (DCCR), composto por 11 experimentos no qual adotou-se, como ponto central, a temperatura e o pH iguais a 50 °C e 5,5, respectivamente, conforme reportado por Cunha *et al.* (2019) e Faria *et al.* (2021).

Os parâmetros foram analisados de acordo com a matriz de experimentos (Tabela 1), adotando-se, como variável resposta, a atividade relativa de transfrutossilagem. Os resultados estão dispostos na Tabela 5.

Tabela 5 - Matriz do Delineamento do tipo Composto Central Rotacional

Ensaio	pH (valor codificado)	pH	Temperatura (valor codificado)	Temperatura (°C)	Atividade Relativa (*) (%)
1	-1	4,5	-1	40	33
2	+1	6,5	-1	40	42
3	-1	4,5	+1	60	2
4	+1	6,5	+1	60	33
5	-1,41	4,09	0	50	13
6	+1,41	6,91	0	50	59
7	0	5,5	-1,41	35,9	45
8	0	5,5	+1,41	64,1	39
9	0	5,5	0	50	85
10	0	5,5	0	50	74
11	0	5,5	0	50	100

(*) A atividade enzimática máxima (285,28 U g⁻¹) foi definida como 100 % da atividade relativa

Fonte: Autor (2024).

Legenda: (*) A atividade enzimática máxima (285,28 U g⁻¹) foi definida como 100 % da atividade relativa

Observou-se que os maiores valores de atividade relativa foram obtidos para a reação enzimática processada a 50 °C e pH 5,5. Além disso, a atividade média de transfrutossilagem ($246,29 \pm 37,23 \text{ U g}^{-1}$) apresentou baixa variação, indicando, portanto, uma boa reprodutibilidade experimental. A temperatura e o pH ótimos de reação, obtidos nesse trabalho, corroboraram com os resultados reportados na literatura envolvendo estudos com células biocatalíticas de *A. oryzae* IPT-301. Cunha *et al.* (2019) avaliaram a temperatura e o pH do meio reacional das células biocatalíticas do microrganismo por planejamento experimental, obtendo-se os maiores valores de atividade, aproximadamente 260 U g^{-1} , para pH abaixo de 6,5 e temperaturas de reação de transfrutossilagem acima de 46 °C. Gonçalves *et al.* (2020) avaliaram o desempenho biocatalítico das células do fungo reticuladas com glutaraldeído e encapsuladas em gel de alginato de cálcio, alcançando-se os maiores valores de atividade em pH 5,5 e 50 °C. Garcia *et al.* (2021) estudaram os efeitos do pH e da temperatura de reação na atividade de transfrutossilagem das células fúngicas reticuladas, obtendo-se os melhores valores de atividade para uma faixa específica de temperatura (50 – 60 °C) e pH (5,0 – 6,0). Por fim, Barbosa (2022) estudou a imobilização de células de *A. oryzae* IPT-301 em esponja de poliuretano e reportou que a temperatura de 50 °C e o pH 5,5 foram os parâmetros do meio reacional que forneceram os maiores valores de atividade de transfrutossilagem.

Após obter as respostas do planejamento experimental, realizou-se a análise estatística dos dados com o auxílio do software Protimiza Experimental Design®, adotando-se como nível de significância $\alpha = 5\%$ (nível de confiança de 95%).

Observou-se na Tabela 6, com exceção dos termos referentes à *temperatura linear* e à interação entre os fatores *pH x temperatura*, que os demais efeitos foram estatisticamente significativos para o modelo quadrático na atividade das células imobilizadas, a um nível de significância de 5 % ($p < 0,05$), fato este comprovado pelo Diagrama de Pareto (Figura 12). Desta forma, elaborou-se a equação do modelo estatístico (Equação 13) constituída apenas pelos termos significativos.

$$A_T = 246,39 - 37,54 \cdot (\text{pH}) - 80,55 \cdot (\text{pH})^2 - 221,73 \cdot (\text{Temperatura})^2 \quad (13)$$

em que A_T se refere à atividade de transfrutossilagem das células microbianas imobilizadas em esponja vegetal.

Tabela 6 - Efeitos estimados, erro padrão e *p*-valor para avaliação dos efeitos do pH e temperatura do meio reacional na atividade de transfrutoseilação das células de *A. oryzae* IPT-301 imobilizadas em esponja vegetal

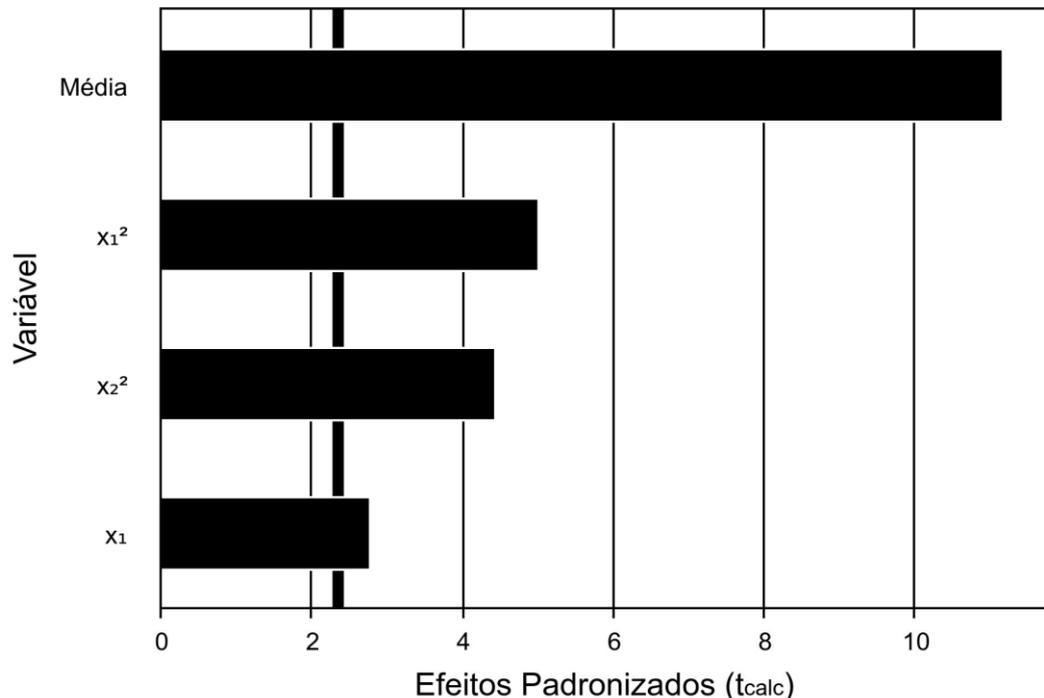
Variáveis	Efeitos Estimados	Erro Padrão	$t_{\text{calculado}}$	<i>p</i> -valor
Média	246,39	22,04	11,18	0,0000
pH (L)*	37,54	13,5	2,78	0,0273
pH (Q)**	-80,55	16,07	-5,01	0,0015
Temperatura (L)*	-17,49	12,99	-1,35	0,2359
Temperatura (Q)**	-71,27	16,07	-4,44	0,0030
pH x Temperatura	15,84	18,37	0,86	0,4280

Fonte: Autor (2024).

Legenda: *L refere-se ao termo linear do modelo estatístico

**Q refere-se ao termo quadrático do modelo estatístico

Figura 12 - Diagrama de Pareto para a variável resposta “atividade relativa” para as células de *A. oryzae* IPT-301 imobilizadas em esponja vegetal



Fonte: Autor (2024).

Legenda: X1 e X2 se referem- aos fatores pH e temperatura do meio reacional, respectivamente.

Os resultados obtidos do planejamento experimental (Tabela 5) sugerem a influência direta do pH da reação na variável resposta visto que, para alterações no valor da temperatura,

a atividade sofreu baixa variação, enquanto que a reação processada em meios reacionais com valores de pH relativamente baixos (meios ácidos) levaram à reduções expressivas nos valores de atividade de transfrutossilação. Isso se relaciona ao fato de que variações no valor de pH podem alterar a conformação enzimática, o que implica em alterações dos sítios ativos. Assim, mudanças no valor de pH influenciam no equilíbrio de ionização de grupos ácidos e básicos, de forma a afetar a distribuição de cargas da enzima, da superfície do suporte, e consequentemente, as interações eletrostáticas entre grupos da proteína e do suporte (Fernandez-Lafuente *et al.*, 1993; Pereira *et al.*, 2015). As interações eletrostáticas atrativas, ocorrem entre cargas residuais de aminoácidos das células e cargas opostas presentes no suporte (Chi *et al.*, 2003). Por isso, as interações que auxiliam na imobilização são dependentes do pH reacional, do ponto isoelétrico da enzima e da distribuição de cargas na superfície do suporte. Quando o pH é igual ao ponto isoelétrico (pI) da proteína, o número de cargas positivas e negativas são iguais e a molécula de enzima passa a ter uma carga líquida neutra. Em condições abaixo do pI as proteínas são positivamente carregadas, enquanto em pH acima do pI as moléculas de enzima estão negativamente carregadas (Rabe; Verdes; Seeger, 2011).

A Tabela 7 apresenta a análise de variância (ANOVA) para o modelo estatístico (Equação 13) aplicado para a atividade biocatalítica das células microbianas imobilizadas. Também foi realizado o *Teste F* (Equação 14) visando verificar se o modelo estatístico gerado explica uma quantidade significativa da variação dos dados experimentais (Rodrigues; Iemma, 2009).

$$Teste F = \frac{\text{Quadrados Médios da Regressão}}{\text{Quadrados Médios dos Resíduos}} \quad (14)$$

Tabela 7 – Resultado da Análise de Variância (ANOVA) para o modelo estatístico com interação para a avaliação dos efeitos de pH e Temperatura do meio reacional na atividade de transfrutossilação das células de *A. oryzae* IPT-301 imobilizadas em esponja vegetal

(continua)

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado médio	F _{calculado}	p-valor
Modelo	61905,6	3	20635,2	14,2	0,00234
Resíduos	10202,3	7	1457,5		
Falta de Ajuste	7420,8	5	1484,2	1,1	0,54879

Tabela 7 – Resultado da Análise de Variância (ANOVA) para o modelo estatístico com interação para a avaliação dos efeitos de pH e Temperatura do meio reacional na atividade de transfrutossilção das células de *A. oryzae* IPT-301 imobilizadas em esponja vegetal

(conclusão)

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado médio	$F_{calculado}$	p-valor
Erro Puro	2781,5	2	1390,8		
Total	72107,9	10			
$R^2 = 85,85 \%$	$F_{3;7; 0,05} = 4,34$				

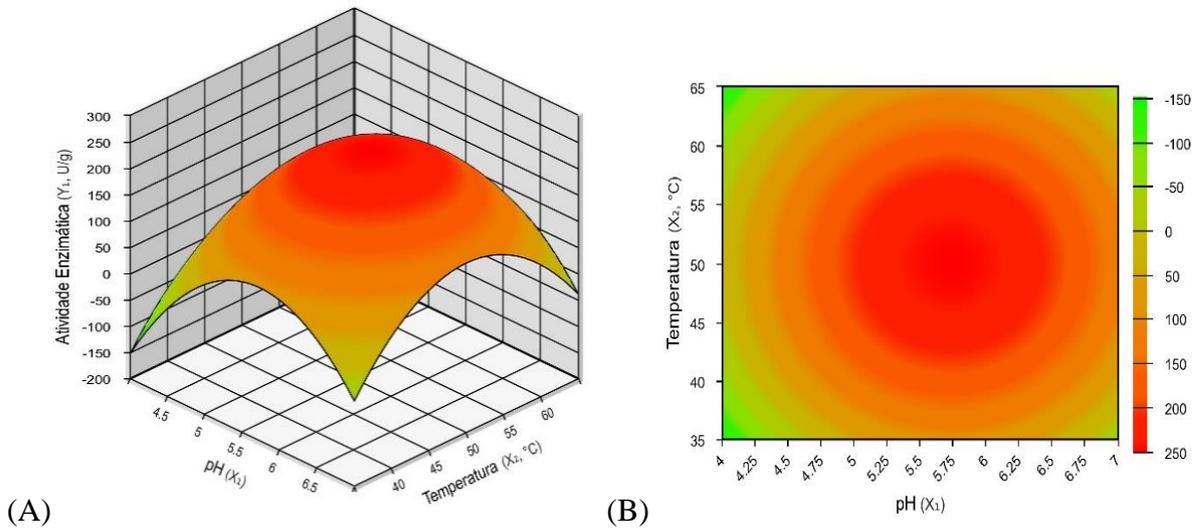
Fonte: Autor (2024).

O ajuste do modelo foi avaliado por meio do coeficiente de determinação de erro (R^2) e cerca de 85,85 % da variabilidade das respostas observadas podem ser explicadas pelo modelo ajustado pela Equação (13). Ressalta-se que o valor de R^2 obtido pode estar relacionado com as possíveis variações oriundas do cultivo celular submerso.

O valor de F calculado pela Equação (14), representado na Tabela 7, foi comparado com o valor de F tabelado de uma distribuição de frequência ($F_{\text{grau de liberdade do modelo; grau de liberdade do desvio; nível de significância}}$). Sendo assim, como o valor de F tabelado, para um nível de significância de 5 %, foi de 4,34 e inferior ao valor de F calculado (14,2), obtido com o modelo, foi possível afirmar que a quantidade de variação devido ao modelo se mostrou maior que a variação não explicada e, portanto, o modelo estatístico foi considerado válido.

Desta forma, o modelo estatístico foi utilizado para a geração da superfície de resposta (Figura 13A) e da curva de contorno (Figura 13B). A superfície de resposta permitiu otimizar as condições reacionais das células biocatalíticas imobilizadas em esponja vegetal. Obteve-se uma faixa ótima de pH (5,0 – 6,5) e temperatura (45 °C – 55 °C) do meio reacional em que foram alcançados os maiores valores de atividade de transfrutossilção. A partir desta análise, definiu-se como parâmetros ótimos de reação o pH 5,75 e temperatura de 50 °C, valores estes utilizados nas etapas posteriores deste trabalho.

Figura 13 - Superfície de resposta e curvas de contorno em função do pH e da temperatura do meio reacional



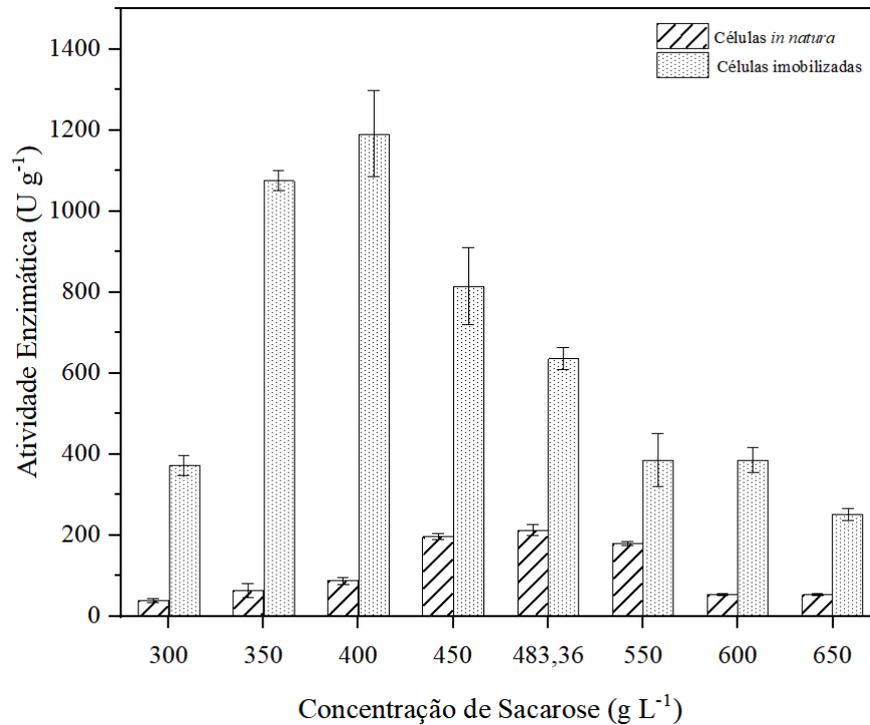
Fonte: Autor (2024).

Legenda: (A) Superfície de resposta para a atividade relativa de transfrutossilção de células de *A. oryzae* IPT-301 imobilizadas em esponja vegetal em função do pH e da temperatura do meio reacional; (B) Curvas de contorno para a atividade relativa de transfrutossilção de células de *A. oryzae* IPT-301 imobilizadas em esponja vegetal em função do pH e da temperatura do meio reacional.

5.3.2 Influência da concentração de substrato na atividade enzimática

A influência da concentração de sacarose do meio reacional na atividade de células biocatalíticas de *A. oryzae* IPT-301, *in natura* e imobilizadas em esponja vegetal, pode ser observada na Figura 14.

Figura 14 - Influência da concentração do substrato na atividade enzimática de células biocatalíticas de *A. oryzae* IPT-301 imobilizadas em esponja vegetal.



Fonte: Autor (2024).

Nota: Condições reacionais: pH 5,75, 50 °C, 190 rpm e 60 minutos

Ao se comparar valores de atividade de células biocatalíticas *in natura* e imobilizadas (Figura 14), obtidas durante as mesmas condições de cultivo, verificou-se que as células imobilizadas mostraram atividade de transfrutossilação relativamente elevadas, cujo maior valor alcançado ($1192,19 \pm 105,98 \text{ U g}^{-1}$), cerca de doze vezes maior quando comparado à atividade das células *in natura*, foi obtido para um meio reacional constituído por 400 g L^{-1} de substrato. Para o caso das células biocatalíticas *in natura*, verificou-se que o maior valor de atividade de transfrutossilação ($212,98 \pm 13,90 \text{ U g}^{-1}$) foi obtido para uma concentração de $483,36 \text{ g L}^{-1}$ de sacarose, corroborando com resultados reportados na literatura (Cunha *et al.*, 2019; Gonçalves *et al.*, 2020; Garcia *et al.*, 2021). Estudos envolvendo a reticulação e a encapsulação de células biocatalíticas de *A. oryzae* IPT-301 mostraram que as maiores atividades do biocatalisador, de aproximadamente 2200 U g^{-1} , também foram obtidas para uma concentração de 400 g L^{-1} de sacarose. (Gonçalves *et al.*, 2020). Garcia *et al.* (2021) avaliaram o efeito da concentração do substrato em células *in natura*, do mesmo microrganismo, reticuladas com solução de glutaraldeído 25% (v v⁻¹). Os autores obtiveram os maiores valores de atividade de transfrutossilação, em torno de 800 U g^{-1} , para uma faixa de concentração de sacarose

compreendida entre 370 e 480 g L⁻¹. Barbosa (2022) investigou a faixa de concentração de substrato para as células biocatalíticas de *A. oryzae* IPT-301 imobilizadas e imobilizadas/reticuladas em esponja de poliuretano, obtendo-se o maior valor de atividade, de aproximadamente 700 U g⁻¹, para uma concentração de 480 g L⁻¹ de sacarose para ambos os casos. Na literatura também foram reportados estudos com células biocatalíticas, *in natura* e imobilizadas, de *A. oryzae* IPT-301 em sistemas reacionais contínuos envolvendo a aplicação dos biocatalisadores em reatores de leito fixo, cujos maiores valores de atividade de transfrutoseilação foram alcançados para uma faixa de 400 a 480 g L⁻¹ de solução de sacarose (Cardoso, 2023; Dias *et al.*, 2022; Ribeiro *et al.*, 2023).

Na Figura 14, observou-se que os valores de atividades de transfrutoseilação para as células biocatalíticas, *in natura* e imobilizadas, diminuíram progressivamente com o aumento da concentração de substrato. Estes resultados sugerem a presença da inibição devido a saturação dos sítios ativos do complexo enzimático pelo substrato e/ou pelo produto, ou uma possível limitação de acessibilidade do substrato aos sítios ativos das enzimas frutoseiltransferases aderidas às células microbianas (Antošová; Polakovič, 2001; Ashfaque; Solomon; Pathak, 2016; Gonçalves *et al.*, 2020). Verificou-se ainda que valores relativamente baixos de atividade enzimática para as células *in natura* (40,16 ± 5,24 U g⁻¹) e imobilizadas em esponja vegetal (373,02 ± 25,21 U g⁻¹) foram obtidos para concentração de 300 g L⁻¹ de substrato. Para baixas concentrações de sacarose, a atividade hidrolítica predomina sobre a atividade de transfrutoseilação (Cunha *et al.*, 2019; Kim *et al.*, 2000). Portanto, a hidrólise das moléculas de sacarose libera moléculas de glicose e frutose no meio reacional e as enzimas frutoseiltransferases, aderidas às células microbianas, são inibidas pela glicose, ocasionando a redução na atividade de transfrutoseilação das células microbianas (Castro; Sato, 2014; Nobre *et al.*, 2018).

5.3.3 Estabilidade térmica e obtenção dos parâmetros termodinâmicos

Os perfis de estabilidade térmica para as células biocatalíticas de *A. oryzae* IPT-301, *in natura* e imobilizadas em esponja vegetal, para uma faixa de temperatura compreendida entre 30 °C e 60 °C ao decorrer de 36 h de incubação, na ausência de substrato, estão apresentado na Figura 15. O modelo não-linear de Sadana e Henley (1987) foi ajustado aos dados experimentais para estimar os valores das constantes de desnaturação térmica de primeira ordem (k_D , em min⁻¹) para as diferentes temperaturas de incubação avaliadas.

Figura 15 - Perfis de estabilidade térmica das células biocatalíticas de *A. oryzae* IPT-301, *in natura* (A) e imobilizadas (B), ao decorrer de 36 horas de incubação para diferentes temperaturas (30 °C, 40 °C, 50 °C e 60 °C)

(continua)

(A)

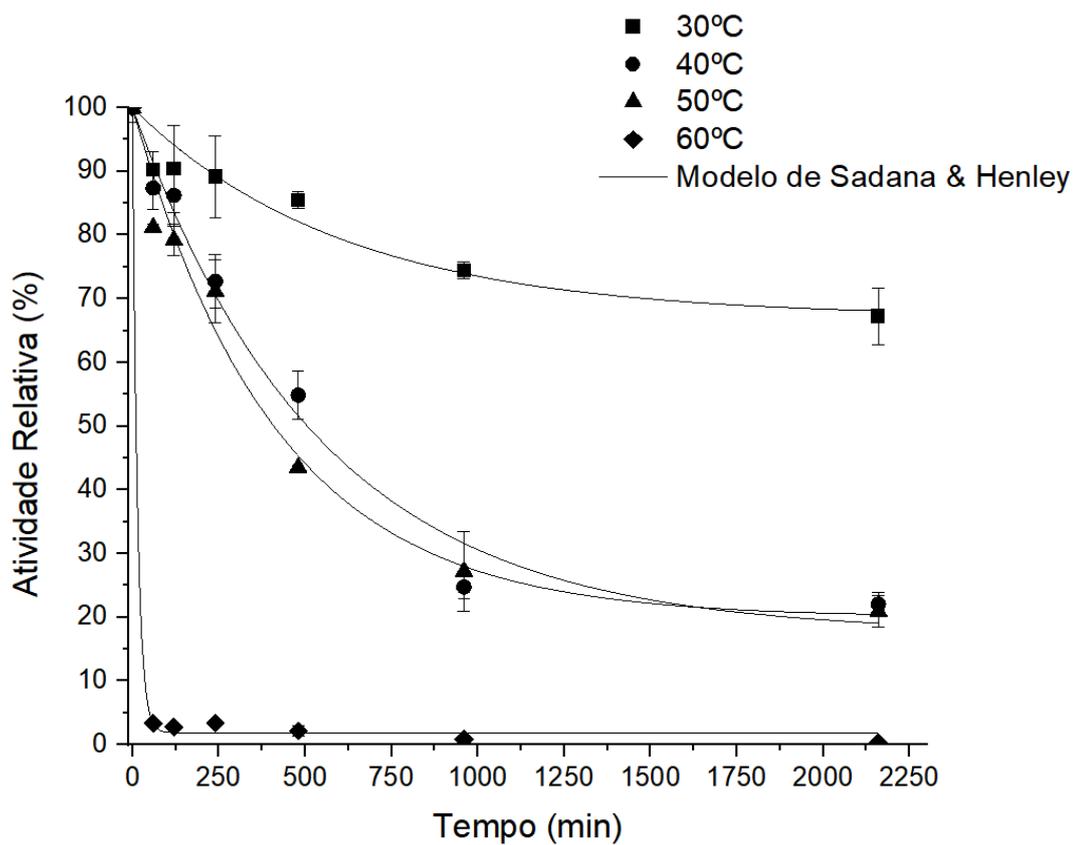
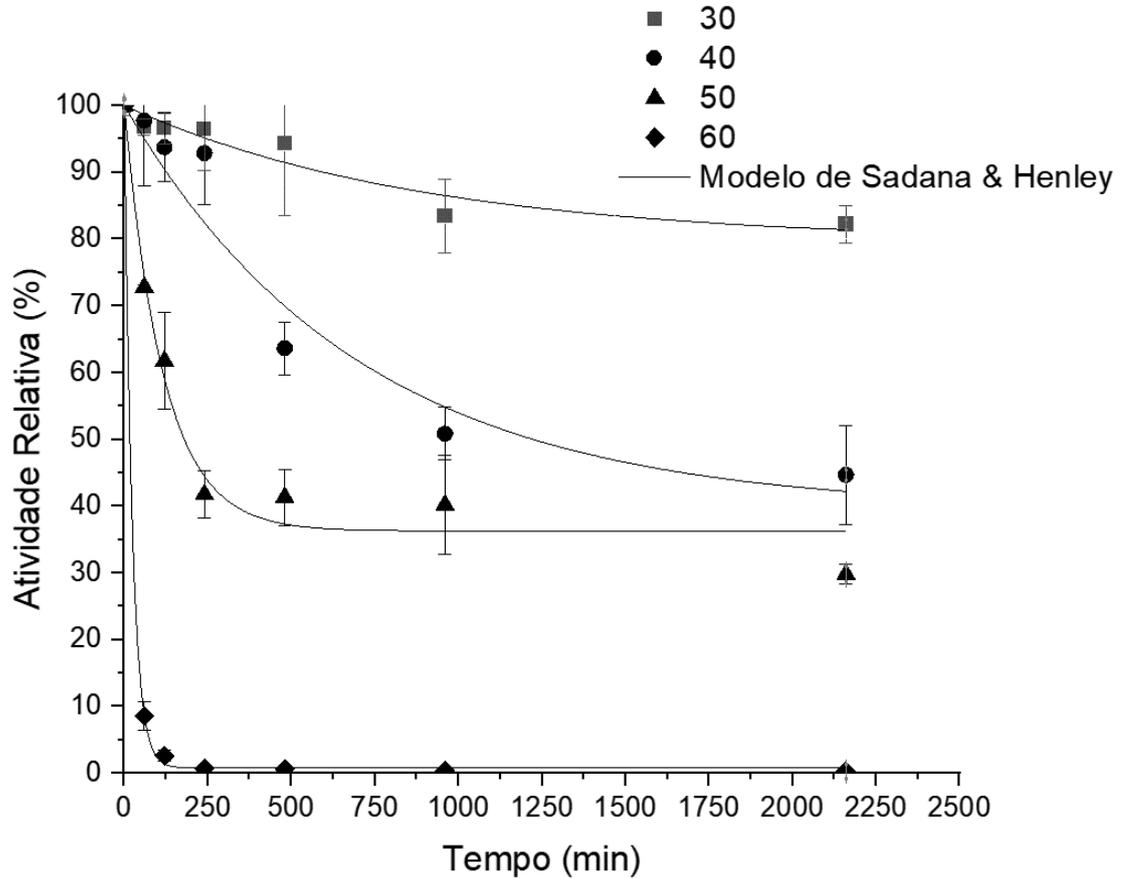


Figura 15 - Perfis de estabilidade térmica das células biocatalíticas de *A. oryzae* IPT-301, *in natura* (A) e imobilizadas (B), ao decorrer de 36 horas de incubação para diferentes temperaturas (30 °C, 40 °C, 50 °C e 60 °C)

(continuação)



(B)

Fonte: Autor (2024).

Nota: A reação ocorreu em meio reacional constituído por solução de sacarose 40 % (m v⁻¹) em tampão tris-acetato pH 5,75 (0,2 mol L⁻¹), com velocidade de agitação de 190 rpm a 50 °C durante 60 min. A atividade enzimática máxima (201,03 ± 4,57 U g⁻¹ para as células *in natura* e 941,55 ± 13,92 U g⁻¹ para as células imobilizadas em esponja vegetal) foi definida como 100 % para o cálculo da atividade relativa

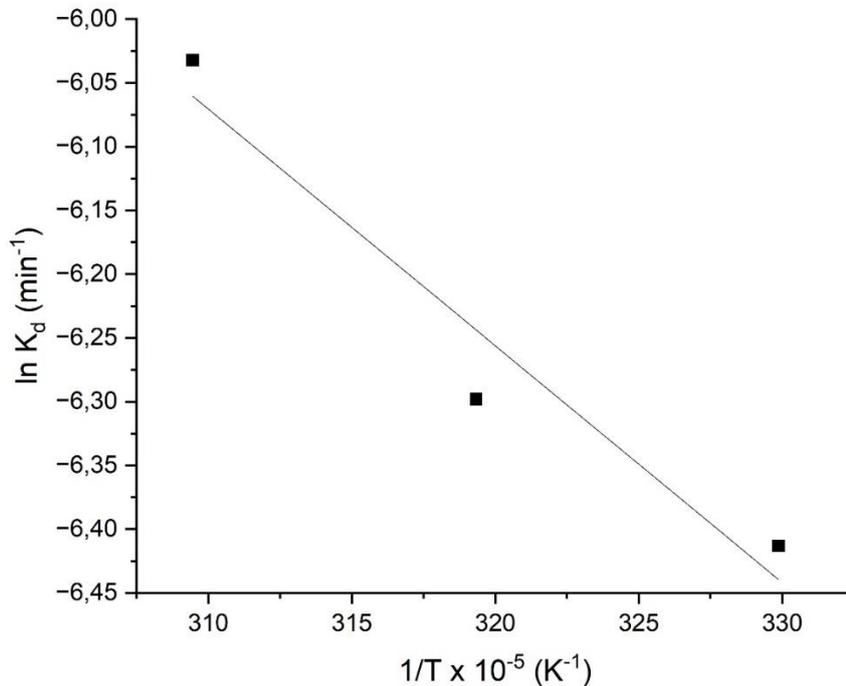
Para ambos os casos, as células biocatalíticas incubadas a 30 °C apresentaram maior estabilidade térmica; porém, após 36 horas de incubação a atividade relativa das células imobilizada (82,22% ± 2,73%) foi maior em comparação com a atividade relativa das células *in natura* (67,23% ± 4,48 %). Notou-se que, para as temperaturas de 40 °C, 50 °C e 60 °C e considerando o mesmo período de tempo, a atividade residual para as células imobilizadas apresentou valores maiores em comparação às células *in natura*, sendo em torno de 44,65% ± 3,98%, 29,81% ± 7,39% e 32,07 ± 0,24%, respectivamente, portanto mostrando-se mais termoestáveis do que as células *in natura*. De acordo com Barbosa (2022), Garcia (2018),

Cunha *et al.* (2019) e Gonçalves *et al.* (2020) as células de *A. oryzae* IPT-301, com atividade de transfrutossilacção, apresentam maior termoestabilidade para uma faixa de temperatura compreendida entre 30 °C e 40 °C.

É importante ressaltar que, em temperaturas mais elevadas, observa-se menor atividade relativa, o que já era esperado, uma vez que em temperaturas elevadas as enzimas aderidas às células microbianas podem sofrer desnaturação térmica, cujas interações moleculares que mantêm o equilíbrio de forças da proteína nativa (pontes de hidrogênio, interações hidrofóbicas e forças de *van der Waals*) são interrompidas, o que afeta a estrutura terciária da enzima fazendo com que sua atividade diminua (Araújo *et al.*, 2022; Barbosa, 2022).

A energia de ativação para a desnaturação térmica (E_D , em kJ mol^{-1}) das células biocatalíticas, *in natura* e imobilizadas em esponja vegetal, foi determinada pela linearização da Equação de *Arrhenius* e podem ser verificadas nas Figuras 16 e 17, respectivamente.

Figura 16 - Determinação da energia de desativação térmica (E_D)



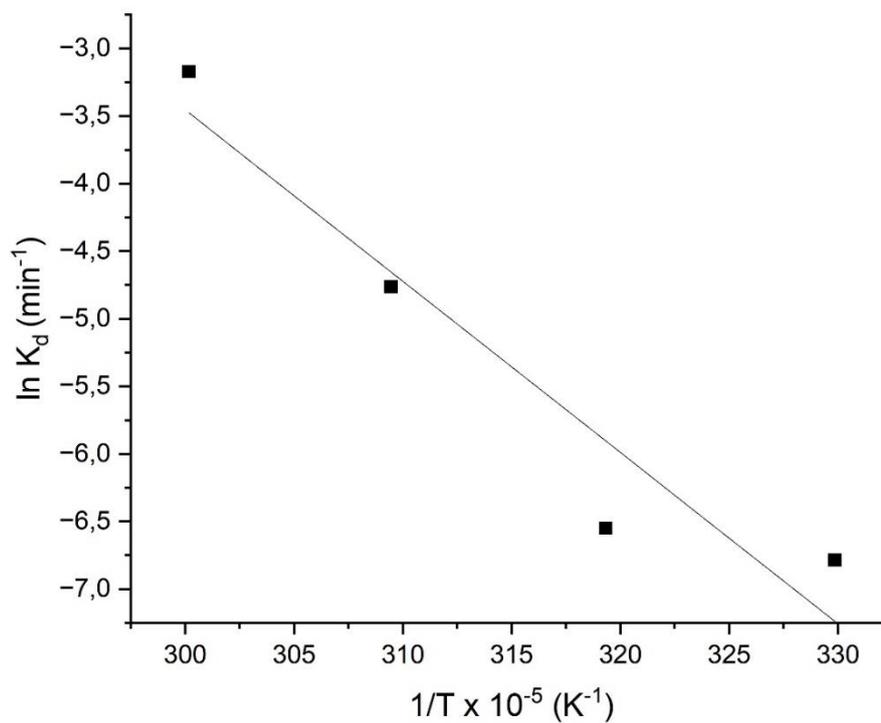
Fonte: Autor (2024).

Nota: A linearização da Equação de *Arrhenius* [$\ln(K_d)$ em função da (T^{-1})] foi utilizada para estimar E_D das células biocatalíticas *in natura* de *A. oryzae* IPT-30.

O ajuste mostrado na Figura 16 exibiu um coeficiente de correlação (R^2) de 88,42 % e a energia de ativação para a desnaturação térmica das células biocatalíticas *in natura* foi obtida pela Equação (15).

$$\ln(K_D) = -0,31 - 1856,59 \frac{1}{T} \quad (15)$$

Figura 17 - Determinação da energia de desativação térmica (E_D)



Fonte: Autor (2024).

Nota: A linearização da Equação de Arrhenius [$\ln(K_d)$ em função da (T^{-1})] foi utilizada para estimar E_D das células imobilizadas de *A. oryzae* IPT-301 em esponja vegetal.

O ajuste mostrado na Figura 17 exibiu um coeficiente de correlação (R^2) de 87,30 % e a energia de ativação para a desnaturação térmica das células biocatalíticas imobilizadas foi obtida pela Equação (16):

$$\ln(K_D) = 34,52 - 12660,05 \frac{1}{T} \quad (16)$$

Os parâmetros termodinâmicos das células biocatalíticas, *in natura* e imobilizada em esponja vegetal, foram calculados a partir das curvas de desnaturação térmica e estão dispostos na Tabela 8

Tabela 8 - Parâmetros termodinâmicos obtidos para as células biocatalíticas de *A. oryzae* IPT-301, *in natura* e imobilizada em esponja vegetal, obtidos para diferentes temperaturas de incubação.

Parâmetro	Célula biocatalítica	Temperatura (°C)			
		30	40	50	60
R ²	<i>In natura</i>	0,88	0,98	0,98	0,99
	Imobilizada	0,90	0,93	0,97	0,99
K _d (min ⁻¹)	<i>In natura</i>	1,64 x 10 ⁻³	1,84 x 10 ⁻³	2,4 x 10 ⁻³	69,59 x 10 ⁻³
	Imobilizada	1,13 x 10 ⁻³	1,43 x 10 ⁻³	8,54 x 10 ⁻³	41,94 x 10 ⁻³
t _{1/2} (min)	<i>In natura</i>	-	610,832	500,269	10,505
	Imobilizada	-	1219,19	179,751	16,711
E _D (kJ mol ⁻¹)	<i>In natura</i>			15,44	
	Imobilizada			105,26	
ΔH _D (kJ mol ⁻¹)	<i>In natura</i>	12,92	12,83	12,75	12,67
	Imobilizada	102,74	102,65	102,57	102,49
ΔG _D (kJ mol ⁻¹)	<i>In natura</i>	100,77	103,88	106,57	100,62
	Imobilizada	101,71	104,53	103,15	102,02
ΔS _D (kJ mol ⁻¹ K ⁻¹)	<i>In natura</i>	-0,29	-0,29	-0,29	-0,26
	Imobilizada	0,0034	-0,0060	-0,0018	0,0014

Fonte: Autor (2024).

Nota: Os valores de k_D e E_D foram obtidos a partir do ajuste dos modelos de Sadana e Henley (1987) e de Arrhenius, respectivamente, aos dados experimentais de atividade enzimática. R² é o coeficiente de correlação para estimativa dos valores de K_D; K_D é a constante de desnaturação térmica de primeira ordem; t_{1/2} é o tempo de meia-vida; E_D é a energia de desativação térmica; ΔH_D é a variação de entalpia de ativação de desnaturação; ΔG_D é a variação da energia de Gibbs de ativação de desnaturação; ΔS_D é a variação de entropia de desnaturação.

Os valores dos tempos de meia vida (t_{1/2}) apresentados na Tabela 8, demonstram que a imobilização enzimática em esponja vegetal aumentou a estabilidade térmica da FTase, uma vez que, o tempo de meia-vida é definido como o tempo requerido para que a atividade enzimática se reduza à metade da atividade inicial a uma dada temperatura (Araújo *et al.*, 2023; Faria *et al.*, 2021; Saqib *et al.*, 2010) e um tempo de meia-vida mais longo indica que o biocatalisador pode resistir a essa temperatura por um período maior, aumentando a possibilidade de sua aplicação industrial (Silva *et al.*, 2021; Souza *et al.*, 2015). Nesse caso, as

células imobilizadas em esponja vegetal demonstraram ser aproximadamente 2 vezes mais estável em comparação a *in natura* na mesma temperatura (40 °C). Além disso, observou-se que o tempo de meia-vida diminuiu com o aumento da temperatura, e a constante de desnaturação térmica de primeira ordem (K_D) aumentou de forma progressiva, indicando a desnaturação enzimática da FTase, aderida às células, com o aumento da temperatura.

A desnaturação térmica de enzimas consiste na modificação irreversível na conformação da biomolécula catalítica e sua ocorrência se deve ao fornecimento de energia de ativação. Logo, quanto maior o valor de E_D , maior a quantidade de energia requerida para a desnaturação da estrutura protéica e, portanto, maior a estabilidade térmica do biocatalisador (Araújo *et al.*, 2023; Saqib *et al.*, 2010). A energia de ativação de desnaturação (E_D) das células catalíticas imobilizadas (105,26 kJ mol⁻¹) foi expressivamente maior que das células catalíticas *in natura* (15,44 kJ mol⁻¹), indicando que as células imobilizadas são, cerca de 7,5 vezes, mais termoestáveis em comparação com as *in natura*.

A variação de entalpia de ativação de desnaturação térmica (ΔH_D), assim como E_D , é um importante parâmetro termodinâmico associado à quantidade total de energia requerida para a desnaturação enzimática (Araújo *et al.*, 2023; Marangoni, 2002; Saqib *et al.*, 2010). Valores elevados e positivos de ambos os parâmetros indicam elevada estabilidade térmica do biocatalisador (Faria *et al.*, 2021; Souza *et al.*, 2015). De acordo com a Tabela 8, os valores de ΔH_D obtidos para as células biocatalíticas imobilizadas em esponja vegetal foram cerca de 8,5 vezes maiores em comparação as *in natura*, indicando maior termoestabilidade das células biocatalíticas imobilizadas em esponja vegetal. Barbosa (2022) obteve valores de E_D para a FTase imobilizada em esponja de poliuretano de 53,94 kJ mol⁻¹, valor aproximadamente 50% menor do que o obtido neste estudo.

A desnaturação térmica da enzima causa a ruptura da estrutura protéica e gera um sistema desordenado, ocasionando o aumento da entropia (Gonçalves *et al.*, 2020; Silva *et al.*, 2021). Desse modo, a desnaturação depende da variação de entropia de ativação para a desnaturação térmica (ΔS_D), parâmetro este que expressa a quantidade de energia por grau de desordem envolvida na transição de um estado nativo para um estado desnaturado do biocatalisador (Marangoni, 2002; Souza *et al.*, 2015). Para as temperaturas de 30 °C e 40 °C das células imobilizadas e para todas as temperaturas das células *in natura* observou-se valores de ΔS_D negativos, o que indica a transição para o estado mais ordenado da enzima.

A variação da energia de Gibbs de ativação de desnaturação (ΔG_D) é o parâmetro mais preciso e confiável para se avaliar a termoestabilidade de biocatalisadores, pois considera

simultaneamente as contribuições da entalpia e da entropia (Araújo *et al.*, 2023; Saqib *et al.*, 2010; Souza *et al.*, 2015). Valores altos e positivos desse parâmetro termodinâmico indicam alta termoestabilidade do biocatalisador (Damodaran, 2005; Marangoni, 2002), proporcionando um aumento na resistência da enzima à desnaturação térmica. A obtenção de valores positivos de ΔG_D também sinalizam que, na condição de equilíbrio, a concentração de proteína no estado nativo é maior do que no estado desnaturado e, portanto, o processo não é espontâneo durante a transição de estado (Faria *et al.*, 2021). Nesse sentido, para ambas as células biocatalíticas avaliadas, *in natura* e imobilizadas, a transição do estado nativo para o estado desnaturado da FTase aderida às células indicou um processo de desnaturação térmica não-espontâneo (Ferreira *et al.*, 2018; Gonçalves *et al.*, 2020).

Barbosa (2021) avaliou a estabilidade térmica para as células de *A. oryzae* IPT-301, com atividade de transfrutossilação, imobilizadas e imobilizadas e reticuladas em matriz de esponja de poliuretano e também obteve resultados satisfatórios, tendo identificado uma maior termoestabilidade para as células imobilizadas em relação as células imobilizadas e reticuladas, onde os valores de $t_{1/2}$ obtidos foram muito próximos para ambos os biocatalisadores, sugerindo que a reticulação celular não afetou a termoestabilidade.

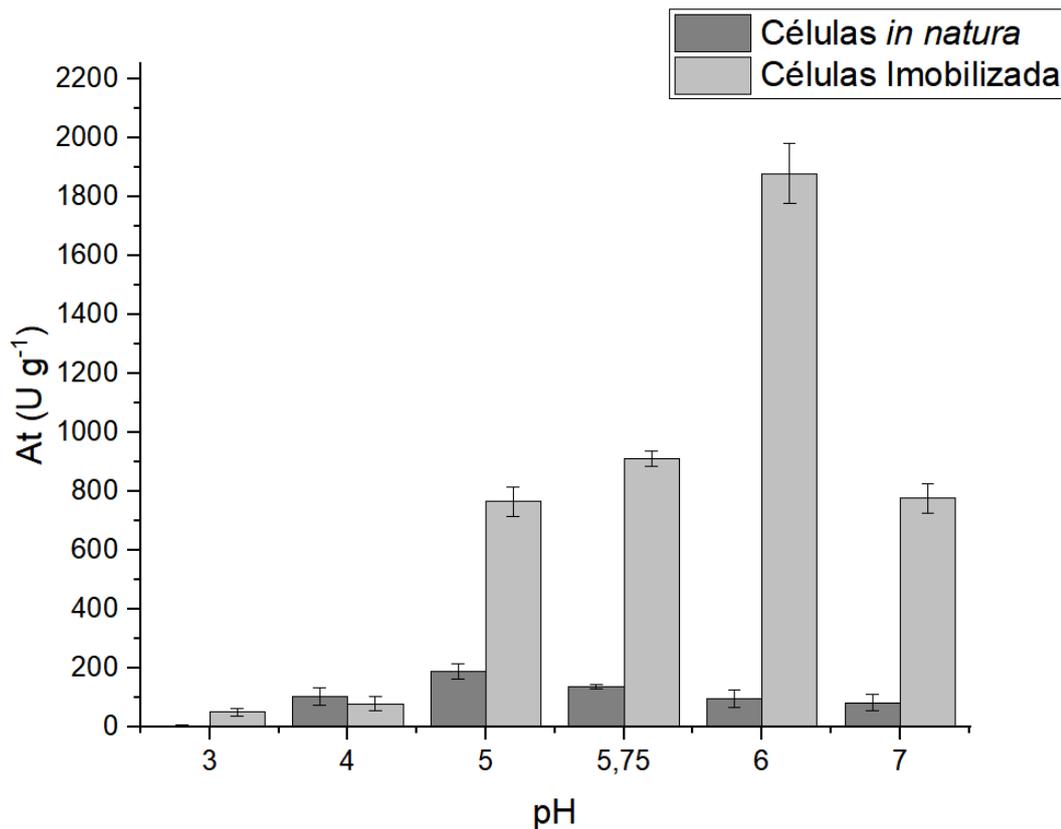
5.3.4 Estabilidade das células biocatalíticas frente ao pH de incubação

Na Figura 17 estão dispostos os resultados do efeito do pH de incubação na atividade de transfrutossilação das células biocatalíticas de *A. oryzae* IPT-301 *in natura* e imobilizadas em esponja vegetal (Figura 18).

As células biocatalíticas imobilizadas em esponja vegetal exibiram maior estabilidade quando comparadas às células microbianas *in natura*, quando submetida a diferentes pH de incubação. Notou-se que para as células imobilizadas, os maiores valores de atividade enzimática foram obtidos para uma faixa de pH compreendida entre 5,0 e 7,0, sendo que no pH 6,0 o biocatalisador apresentou a máxima atividade de transfrutossilação ($1878,48 \pm 102,70 \text{ U g}^{-1}$). Barbosa (2022) demonstrou em seu trabalho que células integras de *A. oryzae* IPT-301 imobilizadas e reticuladas em esponja de poliuretano exibiram maior estabilidade em pH 5,5, que apresentou máxima atividade. Garcia *et al.* (2021) reportaram maior estabilidade da biomassa de *A. oryzae* IPT-301 imobilizada utilizando glutaraldeído como agente de reticulação para uma faixa de pH compreendida entre 5,0 e 6,5, com atividade relativa próxima a 100% em pH 5,5. Gonçalves *et al.* (2020), em estudos sobre a imobilização de frutossiltransferase

microbiana em gel de alginato identificaram o maior valor de atividade relativa também em pH 5,5. Segundo Ganaie; Lateef; Gupta (2014) o biocatalisador obtido a partir de células de *Aspergillus flavus* NFCCI 2364 imobilizado em esferas de alginato reteve sua atividade até pH 7,5. Por fim, Hayashi *et al.* (1992) alcançaram uma faixa de estabilidade ao pH de 5,0 a 10,0 para a FTase micelial de *Aureobasidium pullulans* ATCC 20524 imobilizada em sílica porosa. Com isso, verifica-se que as amplas faixas de estabilidade ao pH encontradas na literatura e nessa pesquisa representam um fator crucial para a aplicação de biocatalisadores em escala industrial, facilitando o próprio processo de produção e até mesmo reduzindo custos com a estocagem (XU *et al.*, 2015).

Figura 18 - Estabilidade enzimática de células biocatalíticas de *A. oryzae* IPT-301, *in natura* e imobilizadas em esponja vegetal, após 24 h de incubação a 4 °C para diferentes valores de pH



Fonte: Autor (2024).

Nota: A reação enzimática ocorreu em meio constituído por solução de sacarose 40 % (m v-1) em tampão tris-acetato 0,2 mol L⁻¹, com velocidade de agitação de 190 rpm a 50 °C durante 60 min.

O processo de imobilização protege os grupos reativos da estrutura da proteína dos efeitos do pH (Verma; Lal; Debnath Das, 2017). Portanto, células microbianas imobilizadas,

com atividade biocatalítica, são mais robustas, estáveis e resistentes à mudanças do meio reacional (Brady; Jordaan, 2009; Mendes *et al.*, 2011). De acordo com Xu *et al.*, (2015), uma ampla faixa de estabilidade frente ao pH favorece o armazenamento e a aplicação industrial de enzimas. Nesse sentido, a ampla faixa de estabilidade ao pH apresentada pelas células biocatalíticas de *A. oryzae* IPT-301 imobilizadas em esponja vegetal pode tornar esse biocatalisador heterogêneo atrativo para a aplicação na produção de fruto-oligossacarídeos em larga escala.

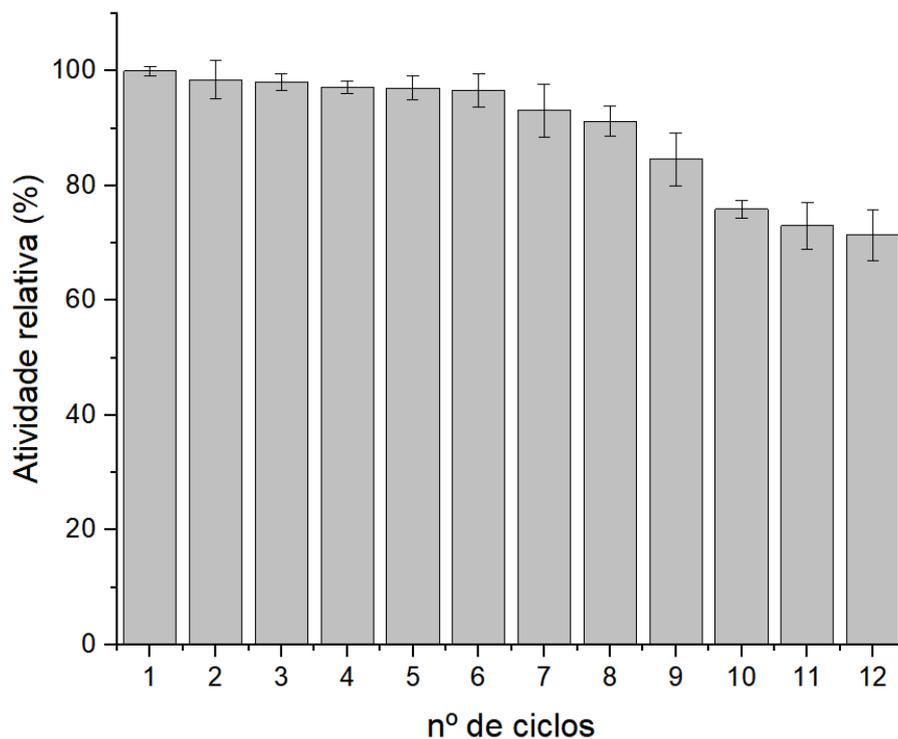
5.3.5 Estabilidade Operacional

A avaliação da estabilidade operacional das células de *A. oryzae* IPT-301 imobilizadas em esponja vegetal foi realizada ao decorrer de 12 ciclos reacionais consecutivos em modo batelada (Figura 19). No 1º ciclo reacional, foram produzidos $83,9 \pm 4,6 \text{ g L}^{-1}$ de FOS, obtendo-se conversão e rendimento de 69,6% e 21,0%, respectivamente. O biocatalisador heterogêneo manteve-se estável ao decorrer dos seis primeiros ciclos reacionais, sem perda significativa de atividade de transfrutoseilação, cujo valor se mostrou estatisticamente igual ($285,94 \pm 2,07 \text{ U g}^{-1}$). A partir do 7º ciclo, observou-se que as células biocatalíticas tiveram uma redução da atividade enzimática, estendendo-se até o 12º ciclo reacional com retenção de $71,45\% \pm 4,42\%$ da atividade inicial. No 9º ciclo reacional consecutivo, o biocatalisador apresentou 40,5% de conversão e 19,8% de rendimento com produtividade de $79,36 \pm 7,91 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ do açúcar prebiótico. No último ciclo operacional, obteve-se uma produtividade de $63,88 \pm 11,45 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ de FOS com rendimento de 16,0% e conversão de sacarose de 32,4% na reação de transfrutoseilação.

A redução nos valores dos parâmetros de desempenho (50% de redução na conversão e 24% de redução no rendimento e na produtividade), pode estar relacionada com a desativação térmica dos sítios ativos do biocatalisador, exposto por até 12h consecutivas na temperatura de reação de 50 °C, hipótese esta que corrobora com os estudos de termoestabilidade enzimática realizados neste trabalho (Figura 15B). Portanto, à medida em que o biocatalisador é reintroduzido em um meio reacional com condições experimentais similares, renova-se a concentração de substrato; porém, aumenta-se a quantidade de sítios ativos desativados termicamente, região em que ocorre a reação enzimática (Marangoni, 2002; Saqib *et al.*, 2010; Araújo *et al.*, 2022). Apesar da redução observada nos parâmetros de desempenho com os testes de reuso do biocatalisador, os resultados obtidos demonstraram um bom desempenho

operacional das células biocatalíticas imobilizadas, tornando-as aptas a serem utilizadas em sistemas reacionais contínuos.

Figura 19 - Estabilidade operacional de células biocatalíticas de *A. oryzae* IPT-301 imobilizadas em esponja vegetal durante ciclos reacionais consecutivos em batelada



Fonte: Autor (2024).

Nota: A reação enzimática ocorreu em meio constituído por solução de sacarose 40% ($m\ v^{-1}$) e tampão tris-acetato $0,2\ mol\ L^{-1}$ (pH 5,75), com velocidade de agitação de 190 rpm a $50\ ^\circ C$ por 60 min. A atividade máxima de transfrutossilção para as células imobilizadas foi de $285,94 \pm 2,07\ U\ g^{-1}$, definida como 100 % para cálculo da atividade relativa.

Garcia *et al.* (2021) reportaram um aumento da estabilidade operacional mediante reticulação de células de *A. oryzae* IPT-301 com glutaraldeído 25% ($v\ v^{-1}$) e obtiveram uma perda de apenas 11,1% da atividade inicial após doze ciclos reacionais consecutivos avaliados. Por sua vez, os estudos de estabilidade operacional realizados por Gonçalves *et al.* (2020) mostraram que a atividade de transfrutossilção de células de *A. oryzae* IPT-301, reticuladas e encapsuladas em alginato de cálcio, retiveram até 52% da atividade inicial para doze ciclos reacionais testados. Ferreira *et al.* (2018a) avaliaram a estabilidade de reuso de β -glicosidase de soja imobilizada em esponja vegetal. Os autores verificaram que, após o sétimo ciclo

reacional, o biocatalisador reteve 50% da sua atividade inicial e, após doze ciclos, obtiveram uma atividade residual de apenas 10%. Barbosa (2022) obtiveram retenções de 50,23% e 60,90% de suas atividades enzimáticas iniciais para as células de *A. oryzae* IPT-301 imobilizadas e imobilizadas/reticuladas em espuma de poliuretano, respectivamente, após doze ciclos reacionais consecutivos, alcançando uma produção média de 100 g L^{-1} de FOS.

5.3.6 Estabilidade de armazenamento do biocatalisador heterogêneo

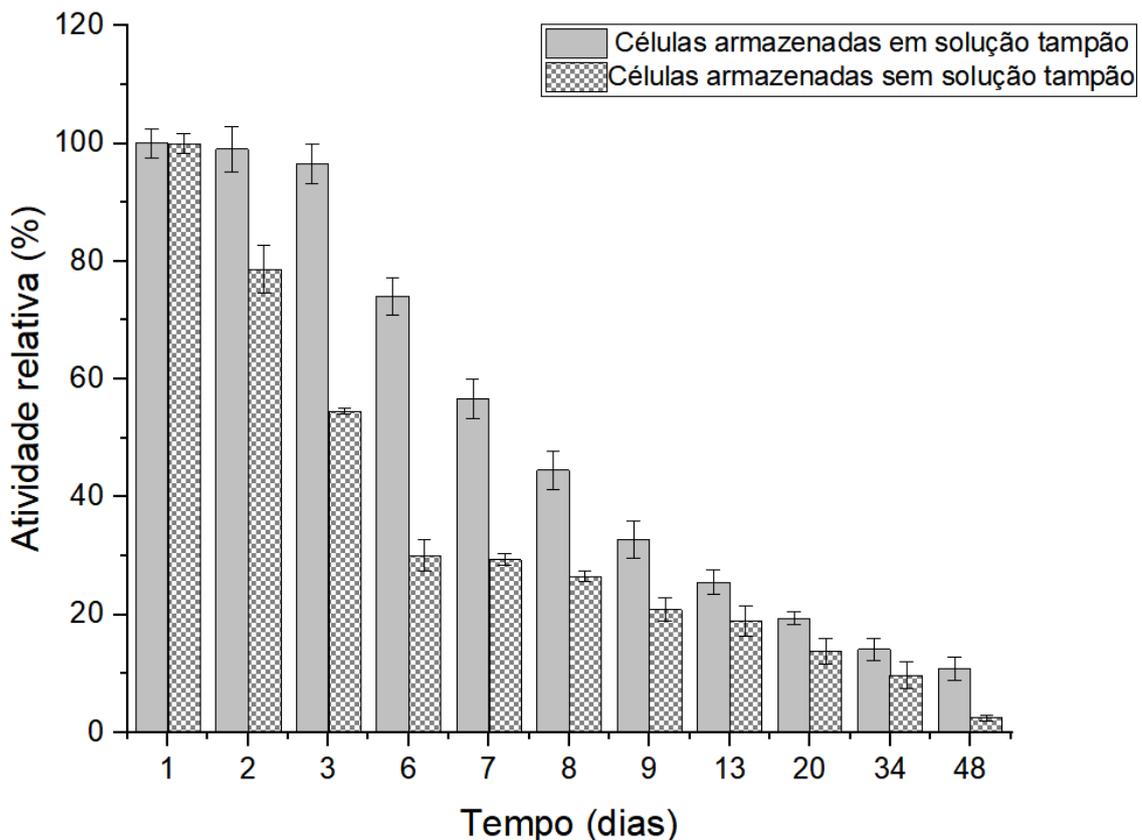
Para verificar a estabilidade de armazenamento, as células biocatalíticas imobilizadas de *A. oryzae* IPT-301 foram mantidas sob refrigeração a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ por 48 dias e armazenadas na ausência e presença de solução tampão tris-acetato pH 6,0 ($0,2 \text{ mol L}^{-1}$). As atividades de transfrutossilação foram monitoradas para ambas as condições ao decorrer do período de estocagem (Figura 20).

Verificou-se uma maior estabilidade de armazenamento para as células biocatalíticas armazenadas em solução tampão tris-acetato pH 6,0 ($0,2 \text{ mol L}^{-1}$) visto que, ao decorrer dos ensaios de armazenamento, as células apresentaram uma maior retenção de atividade de transfrutossilação quando comparadas as células armazenadas, sob refrigeração, na ausência da solução tampão. As células armazenadas em solução tampão mantiveram, praticamente constante, suas atividades (aproximadamente $1153,23 \pm 27,80 \text{ U g}^{-1}$) ao longo dos três primeiros dias de armazenado. Por outro lado, as células biocatalíticas, armazenadas sob refrigeração e na ausência da solução tampão, apresentaram uma redução da atividade de aproximadamente 20% ($780,93 \pm 40,60 \text{ U g}^{-1}$) no segundo dia de armazenamento. Ao término dos ensaios, isto é, após 48 dias de armazenamento, as células biocatalíticas estocadas, na presença e ausência da solução tampão, exibiram retenção de 10,8% e 2,5% de suas atividades iniciais, respectivamente.

Os resultados mostraram que as células biocatalíticas, quando armazenadas em solução tampão pH 6,0, apresentam uma maior retenção da atividade quando comparadas às células armazenadas sem a presença da solução tampão, o que corrobora com os resultados de estabilidade frente ao pH de incubação (Figura 18). Em contrapartida, as amostras que foram armazenadas na ausência da solução tampão podem ter sofrido alteração do pH, no microambiente em que os sítios ativos estão presentes, ao decorrer do tempo de armazenamento, que contribuiu para a rápida perda da atividade do biocatalisador. Uma vez que, cada microrganismo possui uma faixa ideal de pH e alterar o pH fora desse intervalo

reduzirá a atividade enzimática (Robinson, 2015). Nesse sentido, o uso de uma solução tamponante favoreceu o controle do pH e conseqüentemente, manteve a atividade enzimática por mais tempo.

Figura 20 - Estabilidade de armazenamento de células biocatalíticas de *A. oryzae* IPT-301 imobilizadas em esponja vegetal



Fonte: Autor (2024).

Nota: Condições experimentais: a reação ocorreu em meio constituído por solução de sacarose 40 % (m v^{-1}) em tampão tris-acetato pH 5,75 ($0,2 \text{ mol L}^{-1}$), com velocidade de agitação de 190 rpm a $50 \text{ }^\circ\text{C}$ por 60 min. As atividades máximas de transfrutossilatação foram de $1153,23 \pm 27,80 \text{ U g}^{-1}$ e $992,92 \pm 17,18 \text{ U g}^{-1}$ na presença e ausência de solução tampão tris-acetato pH 6,0 ($0,2 \text{ mol L}^{-1}$), respectivamente, e definidas como 100 % para o cálculo da atividade relativa.

Gonçalves *et al.* (2020) reportaram que a biomassa de *Aspergillus oryzae* IPT-301 reticulada e encapsulada em alginato de baixa viscosidade apresentou uma queda de cerca de 5% em sua atividade de transfrutossilatação inicial após nove dias de armazenamento a temperatura de $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Barbosa (2022) verificou maior estabilidade de armazenamento das células integras imobilizadas e reticuladas em esponja de poliuretano, para o mesmo microrganismo, nos primeiros 7 dias de incubação e, após 28 dias, exibiram retenção de 43 % da sua atividade inicial ($396,89 \pm 98,32 \text{ U g}^{-1}$), enquanto as células integras

imobilizadas/reticulas apresentaram retenção de 38 % da sua atividade inicial ($409,62 \pm 107,84 \text{ U g}^{-1}$).

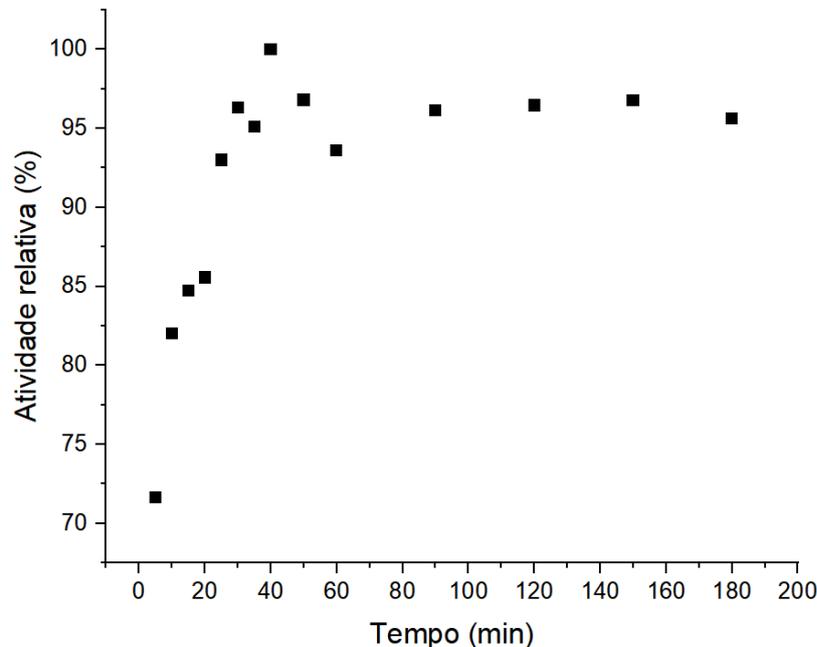
A capacidade de armazenamento das células biocatalíticas imobilizadas pode ser considerado um dos fatores mais expressivos para se avaliar a aplicabilidade industrial. Assim, os biocatalisadores heterogêneos que apresentam maiores valores de estabilidade de armazenamento promovem a otimização do tempo e custos operacionais quando aplicados em processos de larga escala (Araújo *et al.*, 2023; Horn *et al.*, 2006).

5.3.7 Avaliação do desempenho do biocatalisador heterogêneo em reator de leito fixo

A Figura 21 apresenta o perfil de atividade das células biocatalíticas de *A. oryzae* IPT-301 imobilizadas em esponja vegetal, aplicadas como leito biocatalítico, em um reator de leito fixo (PBR) visando a produção de FOS. Inicialmente, verificou-se que o biocatalisador mostrou um rápido aumento na atividade de transfrutossilação, atingindo um valor de $151,10 \text{ U g}^{-1}$. Após 40 minutos de reação, a atividade das células biocatalíticas diminuiu rapidamente e se estabilizou em $145,23 \text{ U g}^{-1}$ a partir de 90 minutos, mantendo-se uma atividade praticamente constante por até 180 minutos, sugerindo maior estabilidade operacional das células biocatalíticas no reator PBR. A redução da atividade enzimática pode ser atribuída à remoção de enzimas aderidas na superfície celular, visto que o biocatalisador está diretamente exposto a um escoamento contínuo da solução de substrato (Cardoso, 2023; Dias *et al.*, 2022; Ribeiro *et al.*, 2023).

Ao se comparar as atividades de transfrutossilação nos diferentes sistemas reacionais, notou-se que as células biocatalíticas exibiram maiores valores de atividade em modo batelada, conforme os resultados apresentados neste trabalho. Os baixos valores de atividades obtidos para o sistema reacional contínuo podem estar relacionados à baixa vazão volumétrica de alimentação da solução de sacarose no reator PBR. Baixas vazões volumétricas contribuem para a formação de uma camada limite difusional de maior espessura presente no entorno do biocatalisador, fazendo com que o processo seja limitado pela transferência de massa externa. À medida que a vazão volumétrica aumenta, a espessura da camada limite diminui, favorecendo o transporte do substrato para os sítios ativos do biocatalisador, região em que ocorre a reação (Dias *et al.*, 2022; Fogler, 2012; Levenspiel, 1999; Ribeiro *et al.*, 2023).

Figura 21 – Perfil de atividade enzimática das células de *A. oryzae* IPT-301, imobilizadas em esponja vegetal, em reator de leito fixo



Fonte: Autor (2024).

Nota: Condições experimentais - massa de leito biocatalítico: 0,84 g de células biocatalíticas imobilizadas; vazão de alimentação em fluxo ascendente: 1 mL min⁻¹; solução de sacarose: 400 g L⁻¹, pH 5,5; temperatura reacional: 50 °C. A atividade máxima de transfrutoseilação para as células imobilizadas foi de 151,10 U g⁻¹, definida como 100 % para cálculo da atividade relativa.

A produção de fruto-oligossacarídeos (FOS) foi monitorada para um tempo de reação enzimática de 180 minutos, obtendo-se uma concentração de 26,51 g L⁻¹ para o açúcar prebiótico. Cardoso (2023) avaliou a produção de FOS em reator PBR empacotado com células biocatalíticas de *A. oryzae* IPT-301 imobilizadas em esponja de poliuretano, sob as mesmas condições experimentais em regime estacionário, obtendo-se uma concentração de 70 g L⁻¹ do produto desejado. Lorenzoni *et al.* (2015) estudaram a produção de FOS em reator de leito fixo PBR, operação contínua, a 50 °C, pH 5,5 e 600 g L⁻¹ de sacarose, empacotado com células de *Aspergillus aculeatus* imobilizados em quitosana, onde obtiveram concentração máxima de 230 g L⁻¹ de FOS. Zambelli *et al.* (2016) observaram a máxima produção de FOS (313 g L⁻¹) em 20 h de tempo de residência em um sistema contínuo, utilizando reator PBR, pH 6 e 600 g L⁻¹ de sacarose, para o microrganismo *Cladosporium cladosporioides* MUT 5506 imobilizado em alginato de sódio.

Observou-se que a partir de 90 minutos de reação, o sistema reacional contínuo atingiu seu estado estacionário, cujo valor de produtividade enzimática estimado foi de $11,7 \text{ U g}^{-1} \text{ min}^{-1}$, parâmetro este, aproximadamente, 2,5 vezes maior que o calculado para o processo em batelada ($4,8 \text{ U g}^{-1} \text{ min}^{-1}$) deste trabalho. Este resultado sugere que as células de *A. oryzae* IPT-301 imobilizadas e usadas como leito biocatalítico em reator PBR permitem maior contato efetivo entre o substrato e o biocatalisador heterogêneo durante a reação de transfrutossilacção da sacarose em comparação com sistemas reacionais operados em modo batelada (Dias *et al.*, 2022).

No estado estacionário também foram calculados os parâmetros de desempenho do sistema reacional contínuo. Para as condições experimentais estabelecidas, foram obtidos valores de conversão e rendimento iguais a 8,31% e 6,63%, respectivamente. Quanto ao valor do parâmetro produtividade mássica, obteve-se $1,89 \text{ g}_{\text{FOS}} \text{ g}_{\text{células}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ para o sistema reacional contínuo, operando o reator PBR a uma vazão de 1 mL min^{-1} , empacotado com 0,84 g de células biocatalíticas do microrganismo imobilizadas em esponja vegetal. Os baixos valores obtidos para os parâmetros de desempenho (conversão, rendimento e produtividade) podem ser atribuídos às condições operacionais do reator PBR, visto que os ensaios foram realizados em uma condição estabelecida conforme a literatura (Lorenzoni, *et al.*, 2015; Zambelli *et al.*, 2016; Dias *et al.*, 2022; Ribeiro *et al.*, 2023; Cardoso, 2023) para se avaliar a potencialidade das células biocatalíticas imobilizadas de *A. oryzae* IPT-301 como leito biocatalítico no sistema reacional contínuo. Ressalta-se que os resultados obtidos para estes parâmetros podem estar associados à formação de caminhos preferenciais e zonas mortas em decorrência do empacotamento do leito biocatalítico, à compactação do leito devido à natureza do material de suporte (no caso, a esponja vegetal) para a imobilização das células microbianas que, por ser orgânico e de origem vegetal, tende a sofrer deformações mecânicas, aos efeitos difusionais internos e externos no leito biocatalítico e a necessidade de estudos de otimização dos parâmetros operacionais do sistema reacional contínuo em específico.

6 CONCLUSÃO

O presente trabalho avaliou a produção e imobilização de células de *Aspergillus oryzae* IPT 301, com atividade de transfrutossilagem, em esponja vegetal, por cultivo celular submerso em meio de cultura sintético. Através da curva de crescimento microbiano, ficou evidenciado que o melhor tempo de cultivo celular foi de 28 h, com atividade média de transfrutossilagem igual a $559,96 \text{ U g}_{\text{seca}}^{-1}$;

As melhores condições do meio reacional foram obtidas para concentração de sacarose 400 g L^{-1} , temperatura de $50 \text{ }^\circ\text{C}$ e pH 5,75 e o melhor pH de armazenamento obtido foi 6,0;

Os estudos termodinâmicos realizados demonstram que a imobilização enzimática em esponja vegetal aumentou a estabilidade térmica da FTase;

Os ensaios de estabilidade operacional mostraram que as células imobilizadas retiveram de $71,45 \pm 4,42\%$ da atividade enzimática inicial ao término de 12 ciclos reacionais consecutivos, com produtividade de $63,88 \pm 11,45 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ de FOS com rendimento de 16,0% e conversão de sacarose de 32,4% na reação de transfrutossilagem;

As análises de armazenamento demonstraram que nos três primeiros dias de armazenamento a atividade enzimática para o biocatalisador estudado foi próxima a 100% e maior que 50% nos primeiros 7 dias. As células biocatalíticas armazenadas em solução tampão tris-acetato pH 6,0 ($0,2 \text{ mol L}^{-1}$) apresentaram maior estabilidade de armazenamento quando comparadas as células armazenadas, sob refrigeração, na ausência da solução tampão;

Durante a aplicação do biocatalisador no reator PBR observou-se a transição do regime transiente para o estacionário no tempo 90 minutos com atividade de $145,23 \text{ U g}^{-1}$ e produtividade enzimática de $11,7 \text{ U g}^{-1} \text{ min}^{-1}$. A produção de fruto-oligossacarídeos (FOS) monitorada para um tempo de reação enzimática de 180 minutos, obteve a concentração de $26,51 \text{ g L}^{-1}$ para o açúcar prebiótico. Foram obtidos valores de conversão, rendimento e produtividade mássica iguais a 8,31% e 6,63% e $1,89 \text{ g FOS g}_{\text{células}}^{-1} \text{ h}^{-1}$, respectivamente.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Para continuidade desse trabalho, são propostas as seguintes sugestões:

- Proposição de modelos de velocidade de reação enzimática, com inibição, que se ajustem aos dados experimentais para estimativa dos parâmetros cinéticos;
- Realizar estudos de armazenamento em substrato;
- Estudos associados à otimização de parâmetros operacionais, de transferência de massa (interna e externa) e de desempenho para o sistema reacional contínuo envolvendo como leito biocatalítico as células de *A. oryzae* IPT-301 imobilizadas em esponja vegetal;
- Estudos de viabilidade técnico-econômica dos processos de produção de FOS nos modos batelada e contínuo.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR-OLIVEIRA, E.; MAUGERI, F. Characterization of the immobilized fructosyltransferase from *Rhodotorula* sp. **International Journal of Food Engineering**, [s.l.], v. 6, n. 3, 2010. Disponível em: <https://www.degruyter.com/document/doi/10.2202/1556-3758.1894/html>. Acesso em: 20 jan. 2024.
- ALI, S.; ASMA, S. T.; NADEEM, S.; SAMAR, M. Strategies and kinetics of industrial fermentation for the mass production of various primary and secondary metabolites from microbes. **European journal of pharmaceutical and medical research**. Paquistão, v. 5, p. 595-606. 2018.
- ALVES, R. de A.; SOUSA, A. M. B.; MADEIRA, D. S. S.; SANTOS, R. M.; PEREIRA, A. L. F.; LEMOS, T. de O.; ABREU, V. K. G. Low-fat beef burgers containing fructooligosaccharides: Physicochemical properties, cooking characteristics, and sensory evaluation. **Journal of Food Processing and Preservation**, [s.l.], v. 44, n. 9, p. e14649, 1 set. 2020. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/jfpp.14649>>. Acesso em: 12 jan. 2024.
- ANGIOLILLO, L.; CONTE, A.; DEL NOBILE, M. A. Technological strategies to produce functional meat burgers. **LWT - Food Science and Technology**, [s.l.], v. 62, n. 1, p. 697–703, 1 jun. 2015.
- ANNUNCIADO, T. R.; SYDENSTRICKER, T. H. D.; AMICO, S. C. Experimental investigation of various vegetable fibers as sorbent materials for oil spills. **Marine Pollution Bulletin**, [s.l.], v. 50, n. 11, p. 1340–1346, 1 nov. 2005.
- ANTOŠOVÁ, M.; POLAKOVIČ, M. Fructosyltransferases: The Enzymes Catalyzing Production of Fructooligosaccharides. *Chem Pap*, [s.l.], v. 55(6), p. 350–358, 2001.
- ANTUNES, A.; MELLO, F. T. de; ARPINI, C. A. de A.; PIASSON, J.; MOREIRA, A. M.; DALLAGO, R. M.; VENQUIARUTO, L. D. Avaliação da potencialidade de adsorção da bucha vegetal (*Luffa cylindrica*) para remoção de corante de meios aquosos. **Tecno-Lógica**, [s.l.], v. 20, n. 2, p. 72, 6 jul. 2016. Disponível em: <https://online.unisc.br/seer/index.php/tecnologica/article/view/6397>. Acesso em: 12 fev. 2024.
- ANTUNES, M. D., SILVA DANNENBERG, G., FIORENTINI, Â. M., PINTO, V. Z., LIM, L. T., DA ROSA ZAVAREZE, E., & DIAS, A. R. G. Antimicrobial electrospun ultrafine fibers from zein containing eucalyptus essential oil/cyclodextrin inclusion complex. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s.l.], v. 104, p. 874–882, 2020. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813017313284>. Acesso em: 16 nov. 2023.
- ARAÚJO, I. M.; BECALETTE, P. C.; DA SILVA, E. S.; DE SOUZA DIAS, G.; DA CUNHA ABREU XAVIER, M.; DE ALMEIDA, A. F.; MAIORANO, A. E.; MORALES, S. A. V.; PERNA, R. F. Enhancement of fructosyltransferase stability by immobilization on polyhydroxybutyrate and glutaraldehyde-activated polyhydroxybutyrate for fructooligosaccharides production. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**,

[s.l.], v. 98, n. 2, p. 419–430, 2023. doi.org/10.1002/jctb.7255. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jctb.7255>>. Acesso em: 8 dez. 2023.

ARRUDA, H. S.; GERALDI, M. V.; CEDRAN, M. F.; BICAS, J. L.; MAROSTICA JUNIOR, M. R.; PASTORE, G. M. Prebiotics and probiotics. **Bioactive Food Components Activity in Mechanistic Approach**, [s. l.]: Elsevier, 2022. p. 55–118. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128235690000060>. Acesso em: 10 dez. 2023.

ASHFAQUE, M.; SOLOMON, S.; PATHAK, N. Kinetic Study of Immobilized Cellobiase Produced from Immobilized Wild-Type *Trichoderma longibrachiatum*. **Sugar Tech**, [s. l.], v. 18, n. 4, p. 340–346, 1 ago. 2016. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s12355-015-0410-1>>. Acesso em: 8 dez. 2023.

ASHKAN, Z.; HEMMATI, R.; HOMAEI, A.; DINARI, A.; JAMLIDOOST, M.; TASHAKOR, A. Immobilization of enzymes on nanoinorganic support materials: An update. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 168, p. 708–721, 2021. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813020350510>. Acesso em: 16 jan. 2024.

BARBOSA, N. R. Imobilização de células de *Aspergillus oryzae* IPT-301 em esponja de poliuretano para a produção enzimática de fruto-oligosacarídeos. 2023. 92 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Alfenas, Poços de Caldas, MG, 2022.

BARRETT, E. P.; JOYNER, L. G.; HALENDA, P. P. The Determination of Pore Volume and Area Distributions in Porous Substances. I. Computations from Nitrogen Isotherms. **Journal of the American Chemical Society**, [s. l.], v. 73, n. 1, p. 373–380, 1951. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ja01145a126>>. Acesso em: 14 fev. 2024.

BEDZO, O. K. K.; MANDEGARI, M.; GÖRGENS, J. F. Comparison of immobilized and free enzyme systems in industrial production of short-chain fructooligosaccharides from sucrose using a techno-economic approach. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, [s. l.], v. 13, n. 5, p. 1274–1288, 1 set. 2019. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ja01145a126>>. Acesso em: 11 fev. 2024.

BELMONTE-IZQUIERDO, Y.; SALOMÉ-ABARCA, L. F.; GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ, J. C.; LÓPEZ, M. G. Fructooligosaccharides (FOS) Production by Micro-organisms with Fructosyltransferase Activity. **Fermentation**, [s. l.], v. 9, n. 11, p. 968, 2023. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2311-5637/9/11/968>. Acesso em: 10 fev. 2024.

BEZERRA, C. S. Imobilização de β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* em diferentes suportes e protocolos de ativação, [s. l.], 2012. Disponível em: <http://repositorio.ufc.br/handle/riufc/10788>. Acesso em: 26 jan. 2024.

BRADY, D.; JORDAAN, J. Advances in enzyme immobilisation. **Biotechnology Letters**, [s. l.], v. 31, n. 11, p. 1639–1650, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10529-009-0076-4>. Acesso em: 4 jan. 2024.

BRUNAUER, S.; EMMETT, P. H.; TELLER, E. Adsorption of Gases in Multimolecular Layers. **Journal of the American Chemical Society**, [s. l.], v. 60, n. 2, p. 309–319, 1938. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ja01269a023>. Acesso em: 11 fev. 2024.

CAETANO, B. F. R.; DE MOURA, N. A.; ALMEIDA, A. P. S.; DIAS, M. C.; SIVIERI, K.; BARBISAN, L. F. Yacon (*Smallanthus sonchifolius*) as a Food Supplement: Health-Promoting Benefits of Fructooligosaccharides. **Nutrients**, [s. l.], v. 8, n. 7, 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34488888/>. Acesso em: 12 jan. 2024.

CANILHA, L.; CARVALHO, W.; SILVA, J. B. A. Biocatalizadores imobilizados: Uso de células e enzimas imobilizadas em processos biotecnológicos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, [s. l.], p. 47–57, jan. 2006.

CARDOSO, M. F. M. Implementação de reator de leito fixo empacotado com células de *Aspergillus oryzae* IPT - 301 imobilizadas em esponja de poliuretano para a produção enzimática de fruto-oligosacarídeos. 2023. 65 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Alfenas, Poços de Caldas, MG, 2023.

CASTRO, R. J. S.; SATO, H. H. Protease from *Aspergillus oryzae* : Biochemical Characterization and Application as a Potential Biocatalyst for Production of Protein Hydrolysates with Antioxidant Activities . **Journal of Food Processing**, [s. l.], v. 2014, p. 1–11, 8 dez. 2014.

CASTRO, C.C.; NOBRE, C.; DURPREZ, M. E.; WEIRELD G.; HANTSON, A. L. Screening and selection of potential carriers to immobilize *Aureobasidium pullulans* cells for fructo-oligosaccharides production. **Biochemical Engineering Journal**, [s. l.], v. 118, p. 82–90, 2017

CHEN, Y.; SU, N.; ZHANG, K.; ZHU, S.; ZHU, Z.; QIN, W.; YANG, Y.; SHI, Y.; FAN, S.; WANG, Z.; GUO, Y. Effect of fiber surface treatment on structure, moisture absorption and mechanical properties of luffa sponge fiber bundles. **Industrial Crops and Products**, [s. l.], v. 123, p. 341–352, 2018. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0926669018305880>. Acesso em: 16 jan. 2024.

CHEN, W. C.; LIU, C. H. Production of β -fructofuranosidase by *Aspergillus japonicus*. **Enzyme and Microbial Technology**, [s. l.], v. 18, n. 2, p. 153–160, 1996. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0141022995000992>. Acesso em: 10 out. 2023.

CHI, E. Y.; KRISHNAN, S.; RANDOLPH, T. W.; CARPENTER, J. F. Physical stability of proteins in aqueous solution: mechanism and driving forces in nonnative protein aggregation. **Pharmaceutical research** [s. l.], v. 20, n. 9, p. 1325–1336, 1 set. 2003. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14567625>. Acesso em: 13 fev. 2024.

CHOUKADE, R.; KANGO, N. Characterization of a mycelial fructosyltransferase from *Aspergillus tamarii* NKRC 1229 for efficient synthesis of fructooligosaccharides. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 286, p. 434–440, 2019. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814619303395>. Acesso em: 01 dez. 2023.

CORREA, A. de C.; LOPES, M. S.; PERNA, R. F.; SILVA, E. K. Fructan-type prebiotic dietary fibers: Clinical studies reporting health impacts and recent advances in their

technological application in bakery, dairy, meat products and beverages. **Carbohydrate polymers**, [s. l.], v. 323, 1 jan. 2024. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37940290/>. Acesso em: 12 jan. 2024.

CRUZ, J.; BARBOSA, O.; RODRIGUES, R. C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; TORRES, R.; ORTIZ, C. Optimized preparation of CALB-CLEAs by response surface methodology: The necessity to employ a feeder to have an effective crosslinking. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, [s. l.], v. 80, p. 7–14, 2012. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1381117712000938> . Acesso em: 20 jan. 2024.

CUNHA, J. S. Produção e caracterização da enzima frutossiltransferase de *Aspergillus oryzae* IPT-301 visando a obtenção de fructooligosacarídeos. 2017. 96 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Alfenas, Poços de Caldas, MG, 2017.

CUNHA, J. S.; OTTONI, C. A.; MORALES, S. A. V.; SILVA, E. S.; MAIORANO, A. E.; PERNA, R. F. Synthesis and characterization of fructosyltransferase from *Aspergillus oryzae* IPT-301 FOR HIGH FRUCTOOLIGOSACCHARIDES PRODUCTION. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, [s. l.], v. 36, n. 2, p. 657–668, 2019. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-66322019000200657&tlng=en. Acesso em: 26 jul. 2023.

DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. D. G.; SOLDI, V. Synthetic applications of immobilized lipases in polymers. **Quimica Nova**, [s. l.], v. 27, n. 4, p. 623–630, 2004. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/262738612_Synthetic_applications_of_immobilized_lipases_in_polymers>. Acesso em: 26 jan. 2024.

DAMODARAN, S. Protein stabilization of emulsions and foams. **Journal of Food Science**, [s. l.], v. 70, n. 3, p. R54–R66, 2006. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2621.2005.tb07150.x>. Acesso em: 06 out. 2023.

DIAS, G. S.; SANTOS, E. D.; XAVIER, M. C. A.; ALMEIDA, A. F.; SILVA, E. S.; MAIORANO, A. E.; PERNA, R. F.; MORALES, S. A. V. Study on the transfructosylation activity of *Aspergillus oryzae* IPT-301 cells in a packed bed reactor aiming at fructooligosaccharide production. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 97, n. 10, p. 2904–2911, 1 out. 2022. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jctb.7163>>. Acesso em: 4 fev. 2024.

DRABIŃSKA, N.; KRUPA-KOZAK, U.; JAROCKA-CYRТА, E. Intestinal Permeability in Children with Celiac Disease after the Administration of Oligofructose-Enriched Inulin into a Gluten-Free Diet-Results of a Randomized, Placebo-Controlled, Pilot Trial. **Nutrients**, [s. l.], v. 12, n. 6, p. 1–15, 1 jun. 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32531982>. Acesso em: 12 jan. 2024.

DWEVEDI, A. Enzyme immobilization: Advances in industry, agriculture, medicine, and the environment. **Enzyme Immobilization: Advances in Industry, Agriculture, Medicine, and the Environment**, p. 1–132, 1 jan. 2016.

DZIOŃEK, A.; WOJCIESZYŃSKA, D.; HUPERT-KOCUREK, K.; ADAMCZYK-HABRAJSKA, M.; GUZIK, U. Immobilization of *Planococcus* sp. S5 Strain on the Loofah Sponge and Its Application in Naproxen Removal. **Catalysts** 2018, 8, 176. [s. l.], v. 8, n. 5, p. 176, 2018. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2073-4344/8/5/176>. Acesso em: 16 mar. 2024.

FARIA, L. L.; MORALES, S. A. V.; PRADO, J. P. Z.; DIAS, G. de S.; DE ALMEIDA, A. F.; XAVIER, M. da C. A.; DA SILVA, E. S.; MAIORANO, A. E.; PERNA, R. F. Biochemical characterization of extracellular fructosyltransferase from *Aspergillus oryzae* IPT-301 immobilized on silica gel for the production of fructooligosaccharides. **Biotechnology Letters**, [s. l.], v. 43, n. 1, p. 43–59, 2021. Disponível em: <https://link-springer-com.ez37.periodicos.capes.gov.br/article/10.1007/s10529-020-03016-7>. Acesso em: 26 jul. 2023.

FERNANDEZ, R. C.; OTTONI, C. A.; DA SILVA, E. S.; MATSUBARA, R. M. S.; CARTER, J. M.; MAGOSSO, L. R.; WADA, M. A. A.; DE ANDRADE RODRIGUES, M. F.; MARESMAS, B. G.; MAIORANO, A. E. Screening of β -fructofuranosidase-producing microorganisms and effect of pH and temperature on enzymatic rate. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 75, n. 1, p. 87–93, 2007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17375295/>. Acesso em: 12 jan. 2024.

FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; ROSELL, C. M.; RODRIGUEZ, V.; SANTANA, C.; SOLER, G.; BASTIDA, A.; GUIŚÁN, J. M. Preparation of activated supports containing low pK amino groups. A new tool for protein immobilization via the carboxyl coupling method. **Enzyme and Microbial Technology**, [s. l.], v. 15, n. 7, p. 546–550, 1993. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/014102299390016U>. Acesso em: 19 abr. 2024.

FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; PALOMO, J. M.; CABRERA, Z.; GUIŚÁN, J. M.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Specificity enhancement towards hydrophobic substrates by immobilization of lipases by interfacial activation on hydrophobic supports. **Enzyme and Microbial Technology**, [s. l.], v. 41, n. 5, p. 565–569, 1 out. 2007. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141022907001780>. Acesso em: 26 jan. 2024.

FERREIRA, A. C. V.; MOREIRA, A. A.; SILVA, J. B.; RIBEIRO, M. L. L. Imobilização de β -glicosidase de soja em bucha vegetal (*Luffa cylindrica*) utilizando trimetafosfato de sódio como ativador. **Evidência**, [s. l.], v. 18, n. 2, p. 177–198, 13 dez. 2018. Disponível em: <https://periodicos.unoesc.edu.br/evidencia/article/view/19611>. Acesso em: 5 jan. 2024.

FERREIRA, M. M.; SANTIAGO, F. L. B.; SILVA, N. A. G. da; LUIZ, J. H. H.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; MENDES, A. A.; HIRATA, D. B. Different strategies to immobilize lipase from *Geotrichum candidum*: Kinetic and thermodynamic studies. **Process Biochemistry**, [s. l.], v. 67, p. 55–63, 2018. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359511317316951>. Acesso em: 13 mai. 2024.

FOGLER SC, Elements of Chemical Engineering Reactions. Prentice-Hall PTR, Upper Saddle River, New Jersey, (2012).

GANAIE, M. A.; LATEEF, A.; GUPTA, U. S. Enzymatic trends of fructooligosaccharides production by micro-organisms. **Applied biochemistry and biotechnology**, [s. l.], v. 172, n.

4, p. 2143–2159, 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24338299>. Acesso em: 12 jan. 2024.

GAO, H.; LU, J.; JIANG, Y.; FANG, Y.; TANG, Y.; YU, Z.; ZHANG, W.; XIN, F.; JIANG, M. Material-mediated cell immobilization technology in the biological fermentation proces. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, [s. l.], v. 15, n. 4, p. 1160–1173, 2021. Disponível em: <https://onlinelibrary-wiley.ez37.periodicos.capes.gov.br/doi/full/10.1002/bbb.2219>. Acesso em: 12 fev. 2024.

GARCIA, R. L.; DIAS, G. S.; MORALES, S. A. V.; XAVIER, M. C. A.; SILVA, E. S.; MAIORANO, A. E.; TARDIOLI, P. W.; PERNA, R. F. Glutaraldehyde-crosslinked cells from *Aspergillus oryzae* IPT-301 for high transfructosylation activity: optimization of the immobilization variables, characterization and operational stability. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, [s. l.], v. 38, n. 2, p. 273–285, 2021. Disponível em: <https://link.springer.com/10.1007/s43153-021-00110-9>. Acesso em: 5 jan. 2024.

GIESE, E. C. Potencial biotecnológico do uso de micro-organismos imobilizados em gel de alginato de cálcio Rio de Janeiro CETEM/MCTI. (Série Tecnologia Ambiental), 2015. 47p.

GONÇALVES, M. C. P.; MORALES, S. A. V.; SILVA, E. S.; MAIORANO, A. E.; PERNA, R. F.; KIECKBUSCH, T. G. Entrapment of glutaraldehyde-crosslinked cells from *Aspergillus oryzae* IPT-301 in calcium alginate for high transfructosylation activity. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, [s. l.], v. 95, n. 9, p. 2473–2482, 2020. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jctb.6429>. Acesso em: 26 jul. 2023.

GONZALEZ-TOMÁS, L.; COLL-MARQUÉS, J.; COSTELL, E. Viscoelasticity of inulin–starch-based dairy systems. Influence of inulin average chain length. **Food Hydrocolloids**, [s. l.], v. 22, n. 7, p. 1372–1380, 2008. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0268005X07002007>. Acesso em: 12 dez. 2023.

GUAN, L.; CHEN, L.; CHEN, Y.; ZHANG, N.; HAN, Y. Expression and Activity Analysis of Fructosyltransferase from *Aspergillus oryzae*. **The protein journal**, [s. l.], v. 36, n. 4, p. 352–360, 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28639160/>. Acesso em: 19 jan. 2024.

GUO, Y.; WANG, L.; CHEN, Y.; LUO, P.; CHEN, T. Properties of Luffa Fiber Reinforced PHBV Biodegradable Composites. **Polymers 2019, Vol. 11, Page 1765**, [s. l.], v. 11, n. 11, p. 1765, 2019. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2073-4360/11/11/1765/htm>. Acesso em: 12 fev. 2024.

HAYASHI, S.; MATSUZAKI, K.; TAKASAKI, Y.; UENO, H.; IMADA, K. Production of β -fructofuranosidase by *Aspergillus japonicus*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, [s. l.], v. 8, n. 2, p. 155–159, 1992. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF01195837>. Acesso em: 12 jan. 2024.

HORN, S. J.; SØRLIE, M.; VAAJE-KOLSTAD, G.; NORBERG, A. L.; SYNSTAD, B.; VÅRUM, K. M.; EIJSINK, V. G. H. Comparative studies of chitinases A, B and C from *Serratia marcescens*. **Biocatalysis and Biotransformation**, [s. l.], v. 24, n. 1–2, p. 39–53, 2006. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10242420500518482>. Acesso em: 5 jan. 2024.

HUANG, M. P.; WU, M.; XU, Q. S.; MO, D. J.; FENG, J. X. Highly Efficient Synthesis of Fructooligosaccharides by Extracellular Fructooligosaccharide-Producing Enzymes and Immobilized Cells of *Aspergillus aculeatus* M105 and Purification and Biochemical Characterization of a Fructosyltransferase from the Fungus. **Journal of agricultural and food chemistry**, [s. l.], v. 64, n. 33, p. 6425–6432, 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27492129/>. Acesso em: 12 jan. 2024.

IQBAL, M.; SAEED, A.; EDYVEAN, R. G. J.; O’SULLIVAN, B.; STYRING, P. Production of fungal biomass immobilized loofa sponge (FBILS)-discs for the removal of heavy metal ions and chlorinated compounds from aqueous solution. **Biotechnology Letters**, [s. l.], v. 27, n. 17, p. 1319–1323, 2005. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s10529-005-0477-y>. Acesso em: 15 fev. 2024.

ISO 9073-1:1989 - Textiles — Test methods for nonwovens — Part 1: Determination of mass per unit. Disponível em: <https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/93d564d8-4adf-4409-9187-9ad7c19255d2/iso-9073-1-1989>. Acesso em: 11 fev. 2024.

ISO 9073-3:1989 - Textiles — Test methods for nonwovens — Part 3: Determination of tensile strength and elongation. Disponível em: <https://www.iso.org/standard/16653.html>. Acesso em: 11 fev. 2024.

IUBMB. Nomenclatura de enzimas. **School of Biological and Chemical Sciences**, p. 20, 2021. Disponível em: <https://www.qmul.ac.uk/sbcs/iubmb/enzyme/>. Acesso em: 19 jan. 2024.

JAIN, V.; AWASTHI, A.; GHOSH, S. Biosynthesis of xylitol by cell immobilization: an insight. **Biomass Conversion and Biorefinery**, [s. l.], v. 1, p. 1–13, 2023. Disponível em: <https://link-springer-com.ez37.periodicos.capes.gov.br/article/10.1007/s13399-022-03724-2>. Acesso em: 12 fev. 2024.

JAY, J. M.; LOESSNER, M. J.; GOLDEN, D. A. **Modern Food Microbiology**. [s.l.] Springer, 2005. 790 p.

KHUENPET, K.; JITTANIT, W.; SIRISANSANEEYAKUL, S.; SRICHAMNONG, W. Effect of pretreatments on quality of Jerusalem artichoke (*Helianthus Tuberosus* L.) tuber powder and inulin extraction. **Transactions of the ASABE**, [s. l.], v. 58, n. 6, p. 1873–1884, 2015. Disponível em: <http://elibrary.asabe.org/abstract.asp?aid=46569&t=3&dabs=Y&redir=&redirType=>. Acesso em: 06 out. 2023.

KARKESZOVÁ K, POLAKOVIČ M. Production of Fructooligosaccharides Using a Commercial Heterologously Expressed *Aspergillus* sp. Fructosyltransferase. **Catalysts**, [s. l.], v. 13, n. 5, p. 843, 2023. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2073-4344/13/5/843>. Acesso em: 16 dez. 2023.

KIM, B. W.; KWON, H. J.; PARK, H. Y.; NAM, S. W.; PARK, J. P.; YUN, J. W. Production of a novel transfructosylating enzyme from *Bacillus macerans* EG-6. **Bioprocess Engineering**, [s. l.], v. 23, n. 1, p. 11–16, 2000. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s004499900078>. Acesso em: 25 nov. 2023.

KRASŇAN, V.; STLOUKAL, R.; ROSENBERG, M.; REBROŠ, M. Immobilization of cells and enzymes to LentiKats®. **Applied microbiology and biotechnology**, [s. l.], v. 100, n. 6, p. 2535–2553, 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26795964/>>. Acesso em: 12 fev. 2024.

KUTHIALA, R.; SINGH PARIHAR, P.; SHIROLE, A.; BRAHMA, S.; VAHIKAR, E.; AGARWAL, H. Benefits of Functional Oligosaccharides (FOS) in treating Functional Bowel Disorders (FBD) and low caloric substitutes for diabetics. **International Research Journal of Engineering and Technology**, 2021.

LAPPONI, M. J.; MÉNDEZ, M. B.; TRELLES, J. A.; RIVERO, C. W. Cell immobilization strategies for biotransformations. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**, [s. l.], v. 33, p. 100565, 2022. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2452223621001218>. Acesso em: 26 jan. 2024.

LASKIN, A. I. Enzymes and immobilized cells in biotechnology. p. 317, 1985.

LATEEF, A.; OLOKE, J.; GUEGUIM-KANA, E.; RAIMI, O. Production of fructosyltransferase by a local isolate of *Aspergillus niger* in both submerged and solid substrate media. **Acta Alimentaria**, [s. l.], v. 41, n. 1, p. 100–117, 2012. Disponível em: <https://akjournals.com/doi/10.1556/aalim.41.2012.1.12>. Acesso em: 21 jan. 2024.

LEVENSPIEL O, Chemical Reaction Engineering. John Wiley & Sons, New York (1999).

L'HOCINE, L.; WANG, Z.; JIANG, B.; XU, S. Purification and partial characterization of fructosyltransferase and invertase from *Aspergillus niger* AS0023. **Journal of Biotechnology**, v. 81, n. 1, p. 73–84, 2000. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168165600002777>. Acesso em: 19 jan. 2024.

LI, Q.; LU, H.; YIN, Y.; QIN, Y.; TANG, A.; LIU, H.; LIU, Y. Synergic effect of adsorption and biodegradation enhance cyanide removal by immobilized *Alcaligenes* sp. strain DN25. **Journal of Hazardous Materials**, [s. l.], v. 364, p. 367–375, 2019. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304389418308975>. Acesso em: 27 mar. 2024.

LIU D.; YANG X.; ZHANG L.; TANG Y.; HE H.; LIANG M.; TU Z.; ZHU H. Immobilization of Biomass Materials for Removal of Refractory Organic Pollutants from Wastewater. **Int J Environ Res Public Health**. [s. l.], v. 19, n. 21, p. 13830, 2022. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1660-4601/19/21/13830>. Acesso em: 22 jan. 2024.

LIU, J.; LV, Y.; LUO, Z.; WANG, H.; WEI, Z. Molecular chain model construction, thermo-stability, and thermo-oxidative degradation mechanism of poly(vinyl chloride). **RSC Advances**, [s. l.], v. 6, n. 38, p. 31898–31905, 2016. Disponível em: <<https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2016/ra/c6ra02354a>>. Acesso em: 12 fev. 2024.

LOBO, A. R.; COLLI, C.; FILISETTI, T. M. C. C. Fructooligosaccharides improve bone mass and biomechanical properties in rats. **Nutrition Research**, [s. l.], v. 26, n. 8, p. 413–420, 2006. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0271531706001242>. Acesso em: 16 out. 2024.

- MACEDO, L. L.; VIMERCATI, W. C.; DA SILVA ARAÚJO, C. Fruto-oligossacarídeos: aspectos nutricionais, tecnológicos e sensoriais. **Brazilian Journal of Food Technology**, [s. l.], v. 23, p. e2019080, 2020. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/bjft/a/ZnJqy6PtvfFdmh3gwYq3xJR/?lang=pt>. Acesso em: 11 fev. 2024.
- MAIORANO, A. E.; PICCOLI, R. M.; DA SILVA, E. S.; DE ANDRADE RODRIGUES, M. F. Microbial production of fructosyltransferases for synthesis of pre-biotics. **Biotechnology letters**, [s. l.], v. 30, n. 11, p. 1867–1877, 2008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18612595/>. Acesso em: 12 jan. 2024.
- MANIKANDAN, S. K.; GIANNAKOUDAKIS, D. A.; PREKODRAVAC, J. R.; NAIR, V.; COLMENARES, J. C. Role of catalyst supports in biocatalysis. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, [s. l.], v. 98, n. 1, p. 7–21, 2023. Disponível em: <https://onlinelibrary-wiley.ez37.periodicos.capes.gov.br/doi/full/10.1002/jctb.7177>. Acesso em: 12 fev. 2024.
- MARANGONI, A. G. Characterization of Enzyme Activity. **Enzyme Kinetics**, 1. ed. [S. l.]: Wiley, 2002. p. 44–60. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/0471267295.ch3>. Acesso em: 4 jan. 2024.
- MARTA, S.; SAAD, I.; SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, [s. l.], v. 42, n. 1, p. 1–16, 2006. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbcf/a/T9SMSGKc8Mq37HXJyhSpM3K/abstract/?lang=pt>. Acesso em: 12 jan. 2024.
- MARTINEZ, C. O.; RUIZ, S. P.; FENELON, C.; MORAIS, G. R.; BAESSO, M. L.; MATIOLI, G. Characterization of curdlan produced by *Agrobacterium* sp. IFO 13140 cells immobilized in a loofa sponge matrix, and application of this biopolymer in the development of functional yogurt. **Journal of the science of food and agriculture**, [s. l.], v. 96, n. 7, p. 2410–2417, 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26219432/>. Acesso em: 26 jan. 2024.
- MASHKOOR, F.; NASAR, A. Preparation, characterization and adsorption studies of the chemically modified *Luffa aegyptica* peel as a potential adsorbent for the removal of malachite green from aqueous solution. **Journal of Molecular Liquids**, [s. l.], v. 274, p. 315–327, 2019. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167732218333087>. Acesso em: 16 jan. 2024.
- MATEO, C.; PALOMO, J. M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUISAN, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology**, [s. l.], v. 40, n. 6, p. 1451–1463, 2007. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/0471267295.ch3>. Acesso em: 20 jan. 2024.
- MENDES, A. A.; DE OLIVEIRA, P. C.; DE CASTRO, H. F.; DE, R.; GIORDANO, L. C. Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. **Química Nova**, [s. l.], v. 34, n. 5, p. 831–840, 2011. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/T3NJvK4Cm8qbJ7BtRV98gyj/>. Acesso em: 4 jan. 2024.

MICHEL, M. R.; RODRÍGUEZ-JASSO, R. M.; AGUILAR, C. N.; GONZALEZ-HERRERA, S. M.; GALLEGOS, A. C. F.-; RODRÍGUEZ-HERRERA, R.; MICHEL, M. R.; RODRÍGUEZ-JASSO, R. M.; AGUILAR, C. N.; GONZALEZ-HERRERA, S. M.; GALLEGOS, A. C. F.-; RODRÍGUEZ-HERRERA, R. Fructosyltransferase Sources, Production, and Applications for Prebiotics Production. **Probiotics and Prebiotics in Human Nutrition and Health**, [s. l.]: InTech, 2016. Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/probiotics-and-prebiotics-in-human-nutrition-and-health/fructosyltransferase-sources-production-and-applications-for-prebiotics-production>. Acesso em: 18 mar. 2024.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, [s. l.], v. 31, n. 3, p. 426–428, 1959. Disponível em: <<https://pubs-acsc-org.ez37.periodicos.capes.gov.br/doi/abs/10.1021/ac60147a030>>. Acesso em: 26 jul. 2023.

MÓL, P. C. G.; JÚNIOR, J. C. Q.; VERÍSSIMO, L. A. A.; BOSCOLO, M.; GOMES, E.; MINIM, L. A.; DA SILVA, R. β -glucosidase: An overview on immobilization and some aspects of structure, function, applications and cost. **Process Biochemistry**, [s. l.], v. 130, p. 26–39, 2023. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359511323001174>. Acesso em: 16 dez. 2023.

MUSSATTO, S. I.; AGUILAR, C. N.; RODRIGUES, L. R.; TEIXEIRA, J. A. Colonization of *Aspergillus japonicus* on synthetic materials and application to the production of fructooligosaccharides. **Carbohydrate Research**, [s. l.], v. 344, n. 6, p. 795–800, 2009. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0008621509000391>. Acesso em: 21 out. 2023.

MUSSATTO, S. I.; MANCILHA, I. M. Non-digestible oligosaccharides: A review. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 68, n. 3, p. 587–597, 5 2007. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861706006151>. Acesso em: 12 jan. 2024.

MUSSATTO, S. I.; PRATA, M. B.; RODRIGUES, L. R.; TEIXEIRA, J. A. Production of fructooligosaccharides and b-fructofuranosidase by batch and repeated batch fermentation with immobilized cells of *Penicillium expansum*. **European Food Research and Technology**, [s. l.], v. 235, n. 1, p. 13–22, 2012. Disponível em: <<https://repositorium.sdum.uminho.pt/handle/1822/19931>>. Acesso em: 26 jan. 2024.

MUTANDA, T.; MOKOENA, M. P.; OLANIRAN, A. O.; WILHELMI, B. S.; WHITELEY, C. G. Microbial enzymatic production and applications of short-chain fructooligosaccharides and inulooligosaccharides: recent advances and current perspectives. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, [s. l.], v. 41, n. 6, p. 893–906, 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24793124>. Acesso em: 12 jan. 2024.

NYONG, B. E.; ITA, O. O.; ITA, P. O.; IDIM, V. Proximate Composition of Luffa Acutangula (Sponge Gourd) Fruit. *SSRN Electronic Journal*, [s. l.], 2021. Disponível em: <https://www.ssrn.com/abstract=3891911>. Acesso em: 13 out. 2023.

NOBRE, C.; ALVES FILHO, E. G.; FERNANDES, F. A. N.; BRITO, E. S.; RODRIGUES, S.; TEIXEIRA, J. A.; RODRIGUES, L. R. Production of fructo-oligosaccharides by *Aspergillus ibericus* and their chemical characterization. **LWT**, [s. l.], v. 89, p. 58–64, 2018.

Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0023643817307533>. Acesso em: 16 jan. 2024.

OTTONI, C. A.; CUERVO-FERNÁNDEZ, R.; PICCOLI, R. M.; MOREIRA, R.; GUILARTE-MARESMA, B.; DA SILVA, E. S.; RODRIGUES, M. F. A.; MAIORANO, A. E. Media optimization for β -Fructofuranosidase production by *Aspergillus oryzae*. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, [s. l.], v. 29, n. 1, p. 49–59, 2012. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/bjce/a/y4HXkFKZ5g8FgDzJrMRwQzn/?lang=en>. Acesso em: 26 jul. 2023.

PEREIRA, M. G.; FACCHINI, F. D. A.; FILÓ, L. E. C.; POLIZELI, A. M.; VICI, A. C.; JORGE, J. A.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; PESSELA, B. C.; GUISAN, J. M.; POLIZELI, M. D. L. T. D. M. Immobilized lipase from *Hypocrea pseudokoningii* on hydrophobic and ionic supports: Determination of thermal and organic solvent stabilities for applications in the oleochemical industry. **Process Biochemistry**, [s. l.], v. 50, n. 4, p. 561–570, 2015. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359511315000136>. Acesso em: 24 nov. 2023.

PEREIRA, R. S.; Imobilização da enzima frutossiltransferase extracelular de *Aspergillus oryzae* IPT-301 em sabugo de milho para a produção de fruto-oligossacarídeos. 2021. 71 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Alenas, Poços de Caldas, MG, 2021.. Disponível em: <<https://bdtd.unifal-mg.edu.br:8443/handle/tede/2063>>. Acesso em: 24 nov. 2023.

PERNA, R. F.; CUNHA, J. S.; GONÇALVES, M. C. P.; BASSO, R. C.; SILVA, E. S.; MAIORANO, A. E. Microbial Fructosyltransferase: Production by Submerged Fermentation and Evaluation of pH and Temperature Effects on Transfructosylation and Hydrolytic Enzymatic Activities. **International Journal of Engineering Research & Science**, [s. l.], v. 4, n. 3, p. 43–50, 2018. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/344259993>. Acesso em: 26 jul. 2023.

PERNA, R. F.; TIOSSO, P. C.; SGOBI, L. M.; VIEIRA, A. M. S.; VIEIRA, M. F.; TARDIOLI, P. W.; SOARES, C. M. F.; ZANIN, G. M. Effects of Triton X-100 and PEG on the Catalytic Properties and Thermal Stability of Lipase from *Candida Rugosa* Free and Immobilized on Glyoxyl-Agarose. **The open biochemistry journal**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 66–76, 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29290831>. Acesso em: 30 set. 2023.

RABE, M.; VERDES, D.; SEEGER, S. Understanding protein adsorption phenomena at solid surfaces. **Advances in colloid and interface science**, [s. l.], v. 162, n. 1–2, p. 87–106, 2011. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21295764/>>. Acesso em: 13 fev. 2024.

RAIMBAULT; MAURICE. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. **Electronic Journal of Biotechnology**, [s. l.], v. 1, n. 3, 1998. Disponível em: <<http://www.ejbiotechnology.info/index.php/ejbiotechnology/article/view/v1n3-9/799>>. Acesso em: 13 fev. 2024.

RAJAGOPALAN, G.; KRISHNAN, C. Functional Oligosaccharides: Production and Action. **ACS Symposium Series**, [s. l.], v. 1329, p. 155–180, 2018. Disponível em: <https://publications.iitm.ac.in/publication/functional-oligosaccharides-production-and-action>. Acesso em: 12 jan. 2024.

RAWAT, H. K.; NATH, S.; SHARMA, I.; KANGO, N. Recent developments in the production of prebiotic fructooligosaccharides using fungal fructosyltransferases. **Mycology**, [s. l.], p. 1–21, 2024. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/21501203.2024.2323713>. Acesso em: 12 out. 2023.

RIBEIRO, B. M.; JUNIOR, L. D. R. D. S.; DIAS, G. D. S.; XAVIER, M. D. C. A.; DE ALMEIDA, A. F.; DA SILVA, E. S.; MAIORANO, A. E.; PERNA, R. F.; MORALES, S. A. V. Cross-linked whole cells for the sucrose transfructosylation reaction in a continuous reactor. **Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly**, [s. l.], v. 30, n. 2, p. 99–110, 2024.

RIBEIRO, J. A.; DOS SANTOS PEREIRA, E.; DE OLIVEIRA RAPHAELLI, C.; RADÜNZ, M.; CAMARGO, T. M.; DA ROCHA CONCENÇO, F. I. G.; CANTILLANO, R. F. F.; FIORENTINI, Â. M.; NORA, L. Application of prebiotics in apple products and potential health benefits. **Journal of Food Science and Technology**, [s. l.], v. 59, n. 4, p. 1249–1262, 2022. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s13197-021-05062-z>>. Acesso em: 10 fev. 2024.

RIGO, D.; GAYESKI, L.; TRES, G. A.; CAMERA, F. D.; ZENI, J.; VALDUGA, E.; CANSIAN, R. L.; BACKES, G. T. Produção Microbiológica de Enzimas: uma Revisão/Microbiological Production of Enzymes: a Review. **Brazilian Journal of Development**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 9232–9254, 2021. Disponível em: <<https://ojs.brazilianjournals.com.br/ojs/index.php/BRJD/article/view/23661>>. Acesso em: 19 jan. 2024.

RIOS, N. S.; PINHEIRO, M. P.; LIMA, M. L. B.; FREIRE, D. M. G.; JÚNIOR, I. J. S.; RODRÍGUEZ-CASTELLÓN, E.; DE SANT'ANA, H. B.; MACEDO, A. C.; GONÇALVES, L. R. B. Pore-expanded SBA-15 for the immobilization of a recombinant *Candida antarctica* lipase B: Application in esterification and hydrolysis as model reactions. **Chemical Engineering Research and Design**, [s. l.], v. 129, p. 12–24, 2018.

ROBERFROID, M. Prebiotics: The Concept Revisited. **The Journal of Nutrition**, [s. l.], v. 137, n. 3, p. 830S–837S, 1 mar. 2007. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002231662209143X>. Acesso em: 16 out. 2023.

ROBINSON, P. K. Enzymes: principles and biotechnological applications. Essays in Biochemistry, [s. l.], v. 59, p. 1–41, 2015. Disponível em: <https://portlandpress.com/essaysbiochem/article/doi/10.1042/bse0590001/88345/Enzymes-principles-and-biotechnological>. Acesso em: 22 jan. 2024.

ROBLE, N. D.; OGBONNA, J. C.; TANAKA, H. A novel circulating loop bioreactor with cells immobilized in loofa (*Luffa cylindrica*) sponge for the bioconversion of raw cassava starch to ethanol. **Applied microbiology and biotechnology**, [s. l.], v. 60, n. 6, p. 671–678, 2003. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12664145>. Acesso em: 26 jan. 2024.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de Experimentos & Otimização de Processos**. 2. ed. [s.l.] (2021).

RODRIGUES, R. C.; VIRGEN-ORTÍZ, J. J.; DOS SANTOS, J. C. S.; BERENQUERMURCIA, A.; ALCANTARA, A. R.; BARBOSA, O.; ORTIZ, C.; FERNANDEZLAFUENTE, R. Immobilization of lipases on hydrophobic supports: immobilization mechanism, advantages, problems, and solutions. **Biotechnology Advances**, [s. l.], v. 37, n. 5, p. 746–770, 2019. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S073497501930062X>. Acesso em: 30 out. 2023.

RODRÍGUEZ-RESTREPO, Y. A.; GIRALDO, G. I.; RODRÍGUEZBARONA, S. Solubility as a fundamental variable in the characterization of wall material by spray drying of food components: Application to microencapsulation of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*. *Journal of Food Process Engineering*, [S. l.], v. 40, n.6, p. e12557, 2017. DOI: 10.1111/JFPE.12557. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jfpe.12557>. Acesso em: 26 fev. 2024.

SADANA, A.; HENLEY, J. P. Single-step unimolecular non-first-order enzyme deactivation kinetics. **Biotechnology and bioengineering**, [s.l.] v. 30, n. 6, p. 717–723, 1987. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18581490>. Acesso em: 30 set. 2023.

SAEED, A.; IQBAL, M. Loofa (*Luffa cylindrica*) sponge: Review of development of the biomatrix as a tool for biotechnological applications. **Biotechnology Progress**, [s.l.], v. 29, n. 3, p. 573–600, 2013. Disponível em: <https://onlinelibrary-wiley.ez37.periodicos.capes.gov.br/doi/full/10.1002/btpr.1702>. Acesso em: 12 fev. 2024.

SANTOS-MORIANO, P.; FERNANDEZ-ARROJO, L.; POVEDA, A.; JIMENEZ-BARBERO, J.; BALLESTEROS, A. O.; PLOU, F. J. Levan versus fructooligosaccharide synthesis using the levansucrase from *Zymomonas mobilis*: Effect of reaction conditions. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, [s.l.], v. 119, p. 18–25, 2015. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1381117715001368>. Acesso em: 26 dez. 2023.

SAQIB, A. A. N.; HASSAN, M.; KHAN, N. F.; BAIG, S. Thermostability of crude endoglucanase from *Aspergillus fumigatus* grown under solid state fermentation (SSF) and submerged fermentation (SmF). **Process Biochemistry**, [s.l.], v. 45, n. 5, p. 641–646, maio 2010. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359511309003936>. Acesso em: 30 set. 2023.

SEPTIYANI, C. R. D.; WIJANARKA, W.; NURHAYATI. The effect of inulinase concentration volume produced by B_3 yeast isolate and hydrolysis time on Fructooligosaccharide (FOS) production from *Dahlia* tuber flour. **AIP Conference Proceedings**, [s.l.], v. 2738, n. 1, 2023. Disponível em: </aip/acp/article/2738/1/040016/2894275/The-effect-of-inulinase-concentration-volume>. Acesso em: 10 fev. 2024.

SETHUPATHY, P.; SURIYAMOORTHY, P.; MOSES, J. A.; CHINNASWAMY, A. Physical, sensory, in-vitro starch digestibility and glycaemic index of granola bars prepared using sucrose alternatives. **International Journal of Food Science & Technology**, [s.l.], v. 55, n. 1, p. 348–356, 2020. Disponível em:

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/ijfs.14312>. Acesso em: 10 fev. 2024.

SHELDON, R. A. Enzyme Immobilization: The Quest for Optimum Performance. **Advanced Synthesis & Catalysis**, [s.l.], v. 349, n. 8–9, p. 1289–1307, 2007. Disponível em:

<<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/adsc.200700082>>. Acesso em: 12 fev. 2024.

SHEU, D. C.; CHANG, J. Y.; WANG, C. Y.; WU, C. T.; HUANG, C. J. Continuous production of high-purity fructooligosaccharides and ethanol by immobilized *Aspergillus japonicus* and *Pichia heimii*. **Bioprocess and biosystems engineering**, [s.l.], v. 36, n. 11, p. 1745–1751, 2013. Disponível em:

<<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/adsc.200700082>>. Acesso em: 12 fev. 2024.

SHULER, M. L.; KARGI, F. Engenharia de Bioprocessos: Conceitos Básicos. p. 576, 2002.

SONG, J.; HE, H.; WANG, Y.; SHAO, L.; WANG, Q.; WEI, Q.; CAI, Y. Shape-stabilized phase change composites supported by biomass loofah sponge-derived microtubular carbon scaffold toward thermal energy storage and electric-to-thermal conversion. *Journal of Energy Storage*, [s. l.], v. 56, p. 105891, 2022. Disponível em:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2352152X22018795>. Acesso em: 22 out. 2023.

SOUZA, C. E. C.; RIBEIRO, B. D.; COELHO, M. A. Z. Characterization and Application of *Yarrowia lipolytica* Lipase Obtained by Solid-State Fermentation in the Synthesis of Different Esters Used in the Food Industry. **Applied biochemistry and biotechnology**, [s. l.], v. 189, n. 3, p. 933–959, 2019. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s12010-019-03047-5>. Acesso em: 19 nov. 2023.

SOUZA, L. T. de A.; VERÍSSIMO, L. A. A.; JOÃO, B. C. P.; SANTORO, M. M.; RESENDE, R. R.; MENDES, A. A. Imobilização enzimática: princípios fundamentais e tipos de suporte. **Biotecnologia Aplicada à Agro&Indústria - Vol. 4**, p. 529–568, 2017.

SOUZA, P. M.; ALIAKBARIAN, B.; FILHO, E. X. F.; MAGALHÃES, P. O.; JUNIOR, A. P.; CONVERTI, A.; PEREGO, P. Kinetic and thermodynamic studies of a novel acid protease from *Aspergillus foetidus*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 81, p. 17–21, 2015.

TAGLIANI, M. R. **Efeitos da expressão heteróloga estável ou adição exógena dos fatores de crescimento TGF-1 e PDGF-BB sobre a cinética de crescimento de células CHO e HEK**. 2023. Mestrado em Engenharia Química - Universidade de São Paulo, São Paulo 2023. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/3/3137/tde-26042023-145710/>. Acesso em: 13 fev. 2024.

TANG, X.; ZHANG, Q.; LIU, Z.; PAN, K.; DONG, Y.; LI, Y. Removal of Cu(II) by loofah fibers as a natural and low-cost adsorbent from aqueous solutions. **Journal of Molecular**

Liquids, [s. l.], v. 191, p. 73–78, 2014. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167732213004145>. Acesso em: 26 out. 2023.

TANOBE, V. O. A.; SYDENSTRICKER, T. H. D.; MUNARO, M.; AMICO, S. C. A comprehensive characterization of chemically treated Brazilian sponge-gourds (*Luffa cylindrica*). **Polymer Testing**, [s. l.], v. 24, n. 4, p. 474–482, 2005. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S014294180500005X>. Acesso em: 10 dez. 2023.

URETA, M. M.; ROMANO, N.; KAKISU, E.; GÓMEZ-ZAVAGLIA, A. Synthesis of fructo-oligosaccharides using grape must and sucrose as raw materials. **Food research international (Ottawa, Ont.)**, [s. l.], v. 123, p. 166–171, 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31284964/>. Acesso em: 12 jan. 2024.

VASCONCELOS, N. M.; PINTO, G. A. S.; ARAGAO, F. A. S. de. **Determinação de açúcares redutores pelo ácido 3,5-dinitrosalicílico: histórico do desenvolvimento do método e estabelecimento de um protocolo para o laboratório de bioprocessos**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2013. (Embrapa Agroindústria Tropical. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 87). Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/982130/determinacao-de-acucares-redutores-pelo-acido-35-dinitrosalicilico-historico-do-desenvolvimento-do-metodo-e-estabelecimento-de-um-protocolo-para-o-laboratorio-de-bioprocessosel>. Acesso em: 19 nov. 2023.

VERMA, S. K.; LAL, M.; DEBNATH DAS, M. Optimization of process parameters for production of antimicrobial metabolites by an endophytic fungus *Aspergillus* sp. CPR5 isolated from calotropis Procera root. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, [s. l.], v. 10, n. 4, p. 225–230, 2017. Disponível em: <http://innovareacademics.in/journals/index.php/ajpcr/article/view/16631>. Acesso em: 16 out. 2023.

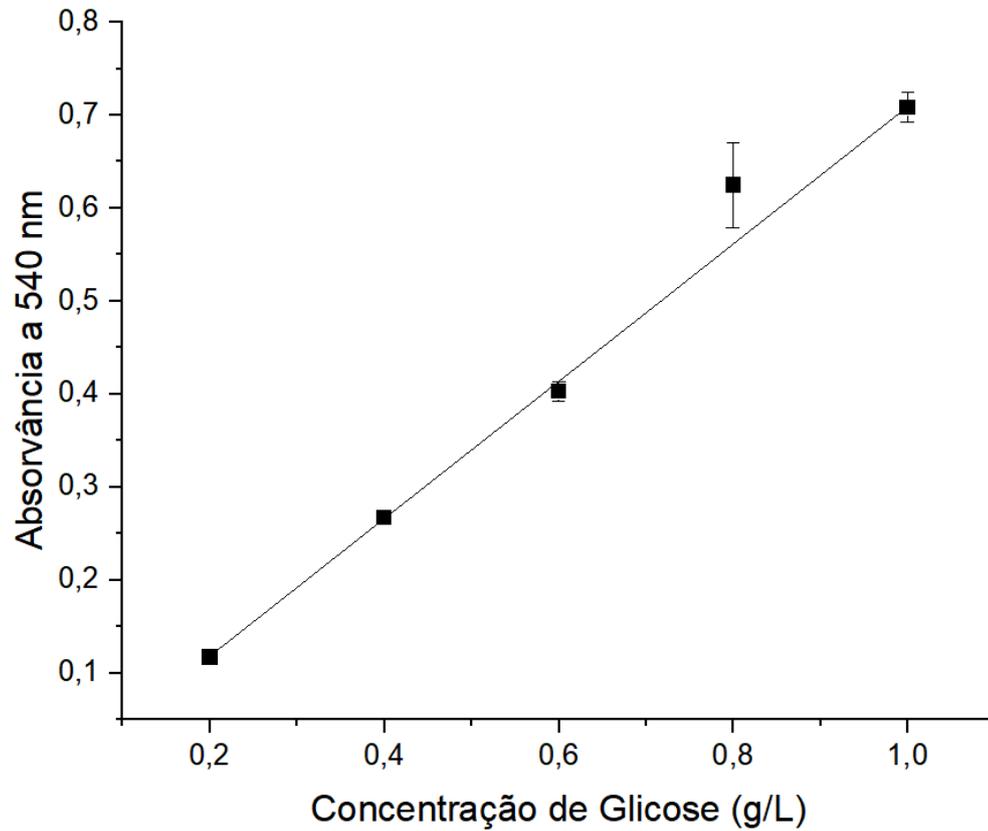
XU, Q.; ZHENG, X.; HUANG, M.; WU, M.; YAN, Y.; PAN, J.; YANG, Q.; DUAN, C. J.; LIU, J. L.; FENG, J. X. Purification and biochemical characterization of a novel β -fructofuranosidase from *Penicillium oxalicum* with transfructosylating activity producing neokestose. **Process Biochemistry**, [s. l.], v. 50, n. 8, p. 1237–1246, 2015. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359511315002470>. Acesso em: 22 dez. 2023.

ZAHIRINEJAD, S.; HEMMATI, R.; HOMAIEI, A.; DINARI, A.; HOSSEINKHANI, S.; MOHAMMADI, S.; VIANELLO, F. Nano-organic supports for enzyme immobilization: Scopes and perspectives. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [s. l.], v. 204, p. 111774, 1 ago. 2021. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927776521002186>. Acesso em: 25 jan. 2024.

ZDARTA, J.; JESIONOWSKI, T. *Luffa cylindrica* sponges as a thermally and chemically stable support for *Aspergillus niger* lipase. **Biotechnology progress**, [s. l.], v. 32, n. 3, p. 657–665, 1 maio 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26918791/>. Acesso em: 26 jan. 2024.

APÊNDICE A - Curva de Calibração para Determinação de Açúcar Redutor

Figura 22 - Curva de calibração obtida pelo método DNS (ácido 3,5-dinitrosilicífico) para a determinação da concentração de açúcares redutores



Fonte: Autor (2024).